

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Nachweis spezifischer Antikörper gegen *Borrelia burgdorferi* in equinen Serumproben
aus dem Bayerischen Haupt- und Landgestüt Schwaiganger
unter Berücksichtigung aktueller Kriterien der Diagnostik

von Katrin Palm
geb. Paffhausen
aus Linz am Rhein

München 2016

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph. D.

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph. D.
Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Hartmut Gerhards

Tag der Promotion: 16. Juli 2016

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	8
2 Literaturübersicht.....	9
2.1 Zur Geschichte der Lyme-Borreliose	9
2.2 <i>Borrelia burgdorferi</i>	10
2.2.1 Taxonomie	10
2.2.2 Morphologie	12
2.2.3 Antigenstruktur	12
2.2.4 Pathogenitätsmechanismen.....	15
2.3 Vektor	16
2.3.1 Taxonomie und Biologie	16
2.3.2 Wirtsfindung und Stechakt.....	19
2.3.3 Übertragung	19
2.3.4 Reservoirwirte	20
2.4 Lyme-Borreliose.....	21
2.4.1 Geographische Verbreitung/Epidemiologie.....	21
2.4.2 Lyme-Borreliose des Menschen	22
2.4.2.1 Krankheitsverlauf	22
2.4.2.2 Immunantwort	23
2.4.3 Lyme-Borreliose des Pferdes.....	24
2.4.3.1 Fallberichte mit Bestätigung durch direkte Nachweismethoden	24
2.4.3.2 Seroepidemiologische Studien.....	28
2.4.3.3 Experimentelle Infektionen und Immunantwort	33
2.5 Diagnostik.....	35
2.5.1 Direkter Erregernachweis.....	37
2.5.1.1 Mikroskopie.....	37
2.5.1.2 Kultivierung	37
2.5.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	38
2.5.2 Indirekter Erregernachweis	39
2.5.2.1 Immunfluoreszenztest	39
2.5.2.2 ELISA	40
2.5.2.3 Immunblot.....	40

3 Material und Methoden	42
3.1. Untersuchungsort.....	42
3.2 Vorausgegangene Studie aus dem Jahr 2007.....	42
3.2.1 Untersuchungsmaterial	42
3.2.1.1 Auswahl der Pferde.....	42
3.2.1.2 Blutproben	43
3.2.1.3 Zecken	44
3.2.2 Labordiagnostische Untersuchungen aus dem Jahr 2007.....	44
3.2.2.1 Indirekter Erregernachweis - Untersuchung der Blutproben	44
3.2.2.1.1 ELISA.....	45
3.2.2.1.1.1 <i>Borrelia burgdorferi</i> Veterinär ELISA (ELISA V)	45
3.2.2.1.1.2 RecomWell Borrelia (ELISA M).....	46
3.2.2.1.2 Indirekter Immunfluoreszenztest (IFAT)	47
3.2.2.1.3 RecomBlot Borrelia (Blot M)	50
3.3 Studie zur Überprüfung der Ergebnisse der vorausgegangenen Studie	52
3.3.1 Untersuchungsmaterial - Blutproben.....	52
3.3.2 Labordiagnostische Untersuchungen aus dem Jahr 2015.....	52
3.3.2.1 <i>Borrelia</i> Veterinär plus OspA Line (Blot V)	52
3.4 Direkter Erregernachweis - Untersuchung der Zecken	54
3.4.1 DNA-Extraktion	54
3.4.2 Real-Time PCR	54
4 Ergebnisse.....	56
4.1 Ergebnisse der vorausgegangenen Arbeit aus dem Jahr 2007.....	56
4.1.1 Vergleich der Testsysteme IFAT, ELISA V, ELISA M und Blot M.....	56
4.2 Ergebnisse der nachfolgend untersuchten Subgruppe aus dem Jahr 2015	60
4.2.1 Vergleich zwischendem Virotech-Blot und dem Mikrogen-Blot	60
4.2.1.1 Gegenüberstellung der Testergebnisse des Virotech-Blots und des Mikrogen-Blots	60
4.2.1.1.1 Gegenüberstellung der Testergebnisse der gesamten Pferde im Virotech-Blot und im Mikrogen-Blot.....	60
4.2.1.1.2 Gegenüberstellung der Testergebnisse der Fohlen im Virotech-Blot und im Mikrogen-Blot	61
4.2.1.2 Gegenüberstellung der Bandenmuster des Virotech-Blots und des Mikrogen-Blots	62

4.2.2 Vergleich zwischen dem Virotech-Blot und dem Virotech ELISA	69
4.2.2.1 Gegenüberstellung der Testergebnisse des Virotech-Blots und des Virotech-ELISA	69
4.2.2.1.1 Gegenüberstellung der Testergebnisse der gesamten Pferde im Virotech-Blot und im Virotech-ELISA	69
4.3 Prävalenz von <i>Borrelia burgdorferi</i> in Zecken des Gestütsgebietes	72
5 Diskussion	73
5.1 Betrachtung der Testergebnisse aus dem Jahr 2007	73
5.2 Betrachtung der Testergebnisse der Subgruppe aus dem Jahr 2015	74
5.2.1 Gegenüberstellung der Testergebnisse des Virotech-Blots und des Mikrogen-Blots.....	74
5.2.2 Gegenüberstellung der Testergebnisse des Virotech-Blots und des Virotech-ELISA.....	77
5.2.3 Bewertung der diagnostischen Eignung der serologischen Testsysteme zum Nachweis von Antikörpern gegen <i>Borrelia burgdorferi</i> beim Pferd	79
5.2.4 Schlussfolgerungen.....	81
6 Zusammenfassung.....	82
7 Summary.....	84
8 Literaturverzeichnis	86
9 Abbildungsverzeichnis	99
10 Tabellenverzeichnis	100
11 Abkürzungsverzeichnis	101
12 Anhang.....	102
Anhang A:	102
12.1 Verwendetes Arbeitsmaterial	102
12.1.1 Testsysteme/Test-Kits	102
12.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme	104
12.1.3 Rezepte der Puffer und Lösungen	104
12.1.3.1 Indirekter Immunfluoreszenztest	104
12.1.3.2 RecomWell Borrelia (ELISA M)	104
12.1.3.3 RecomBlot Borrelia IgG(Blot M).....	105
12.1.3.4 <i>Borrelia</i> Veterinär plus OspA Line (Blot V)	105
12.1.3.5 DNA-Extraktion.....	105
12.1.4 Geräte	106
12.1.5 Laborkleinmaterial und Verbrauchsmaterial	107
Anhang B:	108
12.2 Übersicht Blutproben	108

Anhang C:	114
12.3 Auszüge aus den Ergebnissen der Studie aus dem Jahr 2007	114
12.3.1 IFAT	114
12.3.2 ELISA M	115
12.3.3 ELISA V	116
12.3.4 Blot M	117
Danksagung	118

1 Einleitung

Die Lyme-Borreliose ist die häufigste durch Zecken übertragene Zoonose der nördlichen Hemisphäre. Verursacher dieser multisystemischen Erkrankung sind Spirochäten der Gattung *Borrelia*. Aus dem *Borrelia burgdorferi* sensu lato-Komplex treten in Europa mindestens drei pathogene Genospezies, *B. afzelii*, *B. garinii* und *B. burgdorferi* sensu stricto auf; letztere stellt den alleinigen Krankheitserreger in Nordamerika dar. Der Holzbock (*Ixodes ricinus*) ist der Hauptüberträger der Lyme-Borreliose in Mitteleuropa. In den meisten europäischen Regionen liegen die durchschnittlichen Infektionsraten für *I. ricinus* bei 10-20 % (Fingerle, 2008). In Endemiegebieten sind Pferde aufgrund ihrer häufigen Weidehaltung einem hohen Infektionsrisiko mit *B. burgdorferi* s.l. ausgesetzt. Die meisten Fälle einer equinen Borrelieninfektion scheinen inapparent zu verlaufen (Käsbohrer et al., 1990; Cohen et al., 1992; Tasai et al., 1993; Gerhards et al., 1996; Salinas-Meléndez et al., 2001; Müller et al., 2002; Schönert 2004; Stefancikova et al., 2008). Es existieren jedoch Fallbeschreibungen von mit Borrelieninfektionen assoziierten Erkrankungen beim Pferd mit direktem Nachweis von *B. burgdorferi* s.l. (Burgess et al., 1986; Burgess and Mattison, 1987; Hahn et al., 1996; Liebisch et al., 2002; Grabner et al., 2008; James et al., 2010; Imai et al., 2011; Priest et al., 2012; Sears et al., 2012). Demnach sind Manifestationen an Gliedmaßen (insbesondere Gelenke), Haut, Augen und Herz sowie neurologische und Allgemeinstörungen bei Pferden in Zusammenhang mit *B. burgdorferi* s.l.-Infektionen aufgetreten. Ein einheitliches Krankheitsbild ist beim Pferd jedoch nicht definierbar.

Der serologische Nachweis einer Borrelieninfektion ist bis heute, vor allem durch die mangelnde Standardisierung der Untersuchungsmethoden erschwert. Vergleichende Untersuchungen aus der Human- und der Tiermedizin lieferten deutliche Unterschiede in den Resultaten zwischen den Testsystemen (Schönert et al., 2002; May 2009; Ang et al., 2011; Wojciechowska-Koszko et al. 2011). Auch ein eigens im Rahmen dieser Dissertation durchgeführter Vergleich von indirekten Testsystemen aus dem Jahr 2007 zeigte eine deutliche Diskrepanz in den Ergebnissen. Das ursprüngliche Ziel meiner Arbeit war damals die Bestimmung von Serumantikörpern von Pferden des Bayerischen Haupt- und Landgestüts Schwaiganger gegen *B. burgdorferi* s.l., um Aufschluss über die Immunantwort klinisch gesunder Pferde unterschiedlichen Alters und Geschlechts sowie unterschiedlicher Rassezugehörigkeit und Exposition im jahreszeitlichen Verlauf zu erlangen. Zu diesem Zweck wurden die Blutproben des Pferdebestands mittels eines IFAT, eines Immunblot und zweier ELISA untersucht. Ferner wurde die Prävalenz von *B. burgdorferi* s.l. in Zecken des Gestütsgebietes mittels PCR bestimmt. Die widersprüchlichen Resultate der serologischen Untersuchungen wichen erheblich von der diagnostischen Realität ab und ließen keine gesicherten Aussagen über die Immunantwort der Pferde zu. Sie untermauern mehrheitlich, dass die bisher verwendeten Testsysteme und Auswertungskriterien tendenziell viele positive Ergebnisse anzeigen, die als nicht aussagekräftig für eine abschließende Befunderhebung gewertet werden müssen.

Aus diesem Grund war das übergeordnete Ziel dieser Dissertation die Überprüfung der diagnostischen Eignung der in der vorausgegangenen Arbeit eingesetzten Untersuchungsmethoden. Da die gegenwärtige Empfehlung zur serologischen Diagnostik der Lyme-Borreliose sowohl in der Human- als auch der Tiermedizin das Prinzip des Zweistufentests vorsieht (Wilske et al., 2007; Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, 2008; Robert-Koch-Institut, 2013), wurden die Ergebnisse des Immunblots und eines ELISA einer kritischen Betrachtung unterzogen. Dabei wurde im Frühjahr 2015 eine Subgruppe, deren Blutproben bereits 2007 mit diesen beiden Testsystemen untersucht worden sind, erneut mittels eines weiteren Immunblots untersucht. Die Ergebnisse wurden gegenübergestellt und miteinander verglichen, um so eine Aussage über die diagnostische Wertigkeit treffen zu können.

2 Literaturübersicht

2.1 Zur Geschichte der Lyme-Borreliose

Die Ätiologie der Lyme-Borreliose wurde erst in den siebziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts geklärt, obgleich Erstbeschreibungen von Erkrankungsfällen erheblich weiter zurückdatieren. Schon Ende des 18. Jahrhunderts berichtete Buchwald von diffusen, idiopathischen Hautatrophien (Buchwald, A., 1883), die Herxheimer und Hartmann einige Jahre später als *Acrodermatitis chronica atrophicans* bezeichneten (Herxheimer und Hartmann, 1902). Im Jahr 1909 wurde erstmals die sogenannte Wanderröte, das *Erythema migrans*, von Afzelius erwähnt, der einen Zusammenhang zwischen Zeckenstich und nachfolgender Erkrankung herstellte (Afzelius, A., 1910). Bäfverstedt beschrieb 1943 die *Lymphadenosis cutis benigna* bzw. das Lymphozytom (Bäfverstedt, B., 1943).

Im Jahr 1975 erkrankten Einwohner in der Umgebung des Ortes Lyme im Bundesstaat Connecticut (USA) gehäuft an Arthritiden. Da diese Symptomatik hauptsächlich bei Kindern festgestellt wurde, vermuteten die behandelnden Ärzte eine „juvenile rheumatoide Arthritis“, die sogenannte Still'sche Krankheit. Besorgt über die steigende Zahl an Erkrankungen und die unsichere Diagnose wandten sich betroffene Mütter an die Gesundheitsbehörde und forderten eine genaue Untersuchung. Verfolgt wurde der Fall von dem Rheumatologen Allen C. Steere, der die Symptome der Patienten nicht mit dem klassischen Bild der diagnostizierten Erkrankung in Verbindung bringen konnte und dem Krankheitsgeschehen aus diesem Grund einen neuen Namen gab: Lyme-Arthritis (Steere et al., 1977).

Er befasste sich eingehend mit erkrankten Personen und stellte fest, dass sich einige Patienten an eine ringförmige Rötung erinnerten, die Wochen vor Beginn der Gelenkbeschwerden rund um einen vermeintlichen Insektenstich auftrat. Manche der Befragten berichteten sogar von einem Zeckenstich. Auffallend am Verlauf der Krankheit waren ferner Berichte über später auftretende neurologische und kardiologische Beschwerden. Steere sprach fortan von der „Lyme disease“ (Steere et al., 1977). Der vermeintliche Vektor der Erkrankung war damit gefunden, der Erreger jedoch noch nicht. Auf der Suche nach Viren und Rickettsien als vermuteten Erregern entdeckten Steere und Mitarbeiter 1980 in einer Vergleichsstudie an *Erythema-migrans*-Patienten die Penicillinempfindlichkeit des Erregers. Nicht nur Hautrötungen heilten bei mit Penicillin behandelten Patienten im Vergleich zu unbehandelten Patienten rascher ab, sondern auch Folgeerkrankungen blieben signifikant häufiger aus (Steere et al., 1980).

Die Aufklärung gelang Willy Burgdorfer (Montana, USA) 1981, als er bei der Untersuchung von Zecken der Art *Ixodes dammini* auf Rickettsien im Darm zweier weiblicher Exemplare auffallend lange Spirochäten fand, die er später auch aus weiteren Zecken bzw. anderen Zeckenarten isolieren konnte. Nach gelungener Anzüchtung und Antigengewinnung durch Barbour und Burgdorfer wurde der endgültige Nachweis des Erregers der Lyme-Borreliose erbracht. Patientenserum reagierten im Immunfluoreszenztest positiv mit aus Zecken isolierten Spirochäten (Burgdorfer et al., 1982). Nachfolgende klinische und epidemiologische Studien bestätigten das weltweite Auftreten von Infektionen mit *Borrelia burgdorferi* - auch bei verschiedenen Tierarten unter anderem bei Equiden (Lissmann et al., 1984).

2.2 *Borrelia burgdorferi*

2.2.1 Taxonomie

Borrelien sind gram-negative Bakterien, die zur Ordnung Spirochaetales gehören, welche in die Familien Spirochaetaceae und Leptospiraceae unterteilt werden (siehe Tabelle 1). Erstere beinhaltet die Gattung *Borrelia*, benannt nach dem französischen Bakteriologen Amédée Borrel.

Tabelle 1: Systematische Stellung der Gattung *Borrelia*

Reich	Procaryonta	
Ordnung	Spirochaetales	
Familie	Spirochaetaceae	Leptospiraceae
Gattung	<i>Spirochaeta</i>	<i>Leptospira</i>
	<i>Cristispira</i>	<i>Leptonema</i>
	<i>Treponema</i>	<i>Turneria</i>
	<i>Borrelia</i>	
	<i>Serpulina</i>	
	<i>Brachyspira</i>	
	<i>Brevinema</i>	

Die Speziesbezeichnung *Borrelia burgdorferi* erhielt der Erreger 1984 nach seinem Entdecker Willy Burgdorfer. Seit der ersten Isolierung 1981 wurden weltweit sowohl genotypisch, als auch phänotypisch unterschiedliche Borrelienisolat differenziert. Im *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.)-Komplex (siehe Tabelle 2) werden auf der Basis molekulargenetischer Analysen derzeit 19 Genospezies zusammengefasst (Stanek und Reiter, 2011; Rudenko et al., 2011; Casjens et al., 2011).

Während die Humanpathogenität der Genospezies *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. afzelii* und *B. bavariensis* nachgewiesen wurde (Baranton et al., 1992; Canica et al., 1993, Markowicz et al., 2015) und *Borrelia spielmanii* aus frühen Hautmanifestationen (*Erythema migrans*) isoliert werden konnte (Maraspin et al., 2006; Fingerle et al., 2008), ist bis heute unklar, ob die ebenfalls in Europa vorkommenden Genospezies *B. valaisiana*, *B. lusitaniae* und *B. bissettii* auch potentielle Erreger der Lyme Borreliose sind. Gleichwohl wurden sie mehrfach aus Patientenproben isoliert (Wang et al., 1997; Le Fleche et al., 1997; Postic et al., 1998).

Tabelle 2: Genospezies des *B. burgdorferi* sensu lato-Komplexes

Genospezies	Humanpathogenität	Vorkommen	Erstbeschreibung
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	ja	Europa, Asien, USA	Baranton et al., 1992
<i>B. garinii</i>	ja	Europa, Asien	Baranton et al., 1992
<i>B. afzelii</i>	ja	Europa, Asien	Baranton et al., 1992
<i>B. japonica</i>	nein	Asien	Kawabata et al., 1993
<i>B. andersonii</i>	nein	USA	Marconi et al., 1995
<i>B. tanukii</i>	nein	Asien	Fukunaga et al., 1996 a
<i>B. turdi</i>	nein	Asien, Europa	Fukunaga et al., 1996 a
<i>B. valaisiana</i>	unklar	Europa, Asien	Wang et al., 1997
<i>B. lusitaniae</i>	unklar	Europa, Nordafrika	Le Fleche et al., 1997
<i>B. bissettii</i>	unklar	USA, Europa	Bissett and Hill, 1987; Postic et al., 1998
<i>B. sinica</i>	nein	Asien	Masuzawa et al., 2001
<i>B. spielmanii</i>	ja	Europa	Richter et al., 2006
<i>B. yangtze</i>	nein	Asien	Chu et al., 2008
<i>B. californiensis</i>	nein	USA	Postic et al., 2007
<i>B. americana</i>	nein	USA	Rudenko et al., 2009 a
<i>B. carolinensis</i>	nein	USA	Rudenko et al., 2009 b
<i>B. bavariensis</i>	ja	Europa	Margos et al., 2009
<i>B. kurtenbachii</i>	nein	USA	Margos et al., 2010
<i>B. finlandensis</i>	nein	Finnland	Casjens et al., 2011

2.2.2 Morphologie

Borrelien sind helikale Stäbchenbakterien mit 4 bis 10 Windungen um die Längsachse. Ihre Länge beträgt 10 bis 30 μm bei einem Durchmesser von 0,2 bis 0,25 μm . Der Aufbau (siehe Abbildung 1) gliedert sich typischerweise in drei Kompartimente:

Der zentral befindliche Protoplasmazyylinder enthält neben einem linearen Chromosom (bestehend aus über 900.000 Basenpaaren) auch mindestens 17 lineare und zirkuläre Plasmide (mit über 500.000 Basenpaaren) sowie Kernstrukturen und Ribosomen (Fraser et al, 1997). Die trilaminäre Membran wird aus der doppelschichtigen Zytoplasmamembran (innere Membran), welche den Protoplasmazyylinder umhüllt, und einer äußeren Membran gebildet, wodurch der periplasmatische Raum entsteht. In diesem liegen die 7 bis 11 (selten auch bis zu 30) Endoflagellen (Achsfibrillen), die an den Polen inserieren und entlang der Längsachse des Protoplasmazyinders verdrillt sind (Barbour and Hayes, 1986). Durch Kontraktionen (vergleichbar mit Muskelfibrillen) ermöglichen sie den Borrelien eine selbständige, schraubenförmige Bewegung. Die äußere Membran ist schließlich von einer wasserlöslichen Mukoidschicht (S-layer, surface-layer) bedeckt (Weber and Burgdorfer, 1993).

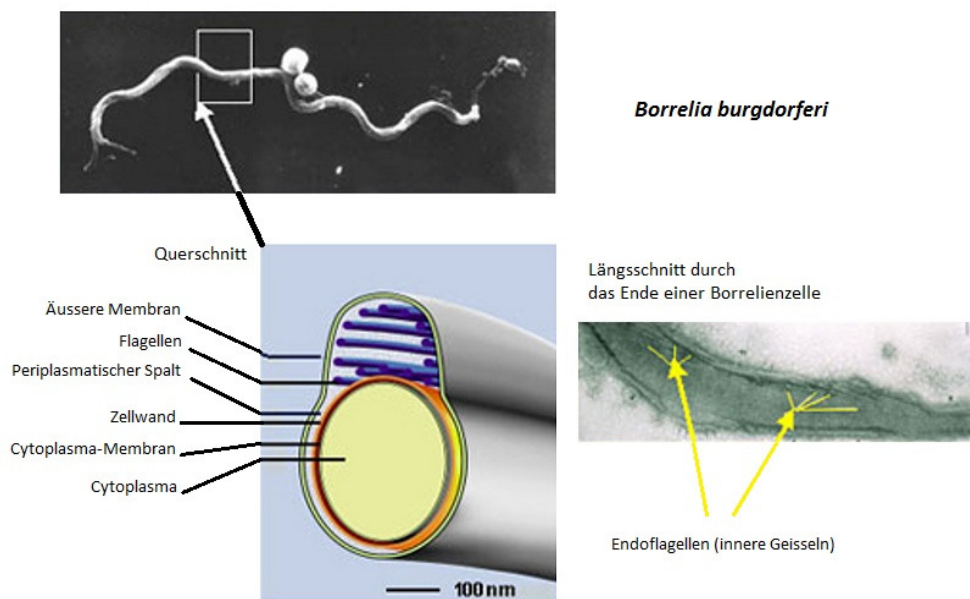


Abbildung 1: Zellanatomie und Querschnitt von *Borrelia burgdorferi*
(Quelle: Rössle, Wanner, Wilke, 2001).

2.2.3 Antigenstruktur

Die Antigene von *Borrelia burgdorferi* s.l. können mittels SDS-Page entsprechend ihres Molekulargewichts (siehe Tabelle 3) aufgetrennt und anhand eines Größenmarkers bestimmt werden. Ihre Bezeichnung setzt sich aus dem Buchstaben „p“ (für Protein) und ihrem entsprechenden Molekulargewicht in Kilodalton zusammen (z.B. p39). Einige Proteine haben aufgrund ihrer Funktion oder Lokalisation Eigennamen.

Die immunologisch bedeutsamsten Oberflächenantigene oder „outer surface proteins“ (Osp) von *B. burgdorferi* bilden eine Fraktion heterogener Lipoproteine, die aufgrund ihres Molekulargewichts in die Gruppen OspA bis OspF eingeteilt wurden. Das Molekulargewicht von OspC liegt im Bereich von 22 bis 24 Kilodalton, das von OspA im Bereich von 31 bis 33 Kilodalton. Insbesondere innerhalb der humanpathogenen Genospezies (*B. burgdorferi* s. s., *B. afzelii*, *B. garinii* und *B. valaisiana*) wurde für OspA und OspC eine ausgesprochene Heterogenität nachgewiesen (Wilske et al., 1992, 1993; Jauris-Heipke et al., 1995). Für OspA wurden zunächst 7 verschiedene Serotypen definiert, die eng mit der genetischen Spezies-Klassifikation korrelieren (Wilske et al., 1993). OspA-Serotyp 1 entspricht der Spezies *B. burgdorferi* s.s., OspA-Serotyp 2 der Spezies *B. afzelii* und die OspA-Serotypen 3-7 der Spezies *B. garinii*, für die später noch ein zusätzlicher Serotyp 8 definiert wurde (Baranton et al., 1992; Wilske et al., 1996). Diese Unterschiede sind für die Diagnostik von großer Bedeutung, da die verschiedenen OspA-Serotypen mit unterschiedlichen klinischen Manifestationen beim Menschen assoziiert werden (Wilske et al., 1993; van Dam et al., 1993). So sollen Lyme-Arthritiden vornehmlich bei Infektionen mit *B. burgdorferi* s. s. entstehen. Letztere sollen ebenso wie Infektionen mit *B. garinii* auch an der Entstehung der Neuroborreliose beteiligt sein. Für Hautmanifestationen wie die *Acrodermatitis atrophicans* werden hingegen vor allem Infektionen mit *B. afzelii* verantwortlich gemacht (Balmelli and Piffaretti, 1995).

Bislang wurden 22 OspC Serotypen identifiziert (Brisson and Dykhuizen, 2004). Während OspA, das der Adhäsion der Borrelien im Vektor dient, im Darm nüchterner Zecken exprimiert wird, wird das Lipoprotein OspC während der Blutmahlzeit gebildet (Fingerle et al., 1995; Pal et al., 2000; Fingerle et al., 2002; Pal et al., 2004). Die Konzentration an OspC nimmt zu, wenn die Spirochäten den Zeckenmitteldarm verlassen und in die Speicheldrüsen eindringen. Pal und Mitarbeiter stellten fest, dass OspC-defizienten Borrelien die Fähigkeit fehlt, in die Speicheldrüsen von Zecken einzuwandern. Somit scheint OspC eine wichtige Rolle beim Übertragungsprozess vom Vektor auf den Wirt zu spielen (Pal et al., 2004).

Ein weiteres für den Infektionsprozess bedeutendes Oberflächenlipoprotein, dessen Synthese ebenfalls durch den Saugakt reguliert wird und dessen Aktivierung bei der Übertragung auf den Wirt stattfindet, ist das plasmidcodierte VlsE (variable major protein) (Salyers and Witt, 2002; Fischer et al., 2003; Liang et al., 2004). Das Molekulargewicht dieses Proteins beträgt etwa 66 Kilodalton. Bykowski und Mitarbeiter demonstrierten in einer Untersuchung, dass VlsE in verschiedenen Gewebetypen unterschiedlich stark exprimiert wird (Bykowski et al., 2006). Außerdem wird vermutet, dass dieses Protein aufgrund der kombinatorischen Antigenvariation als „immune escape“-Mechanismus, wesentlich zur Persistenz von *B. burgdorferi* s.l. im infizierten Säugerorganismus beiträgt (siehe Kapitel 2.2.4).

Als „Protein im 100 kD-Bereich“ (Wilske et al., 1992) oder auch p83/100-Protein (Rössler et al., 1995) wird ein Protein des protoplasmatischen Zylinders (Luft et al., 1992) bezeichnet, dessen Molekulargewicht eine große Variabilität von 83 bis 100 kD aufweist. Es ist hochspezifisch für *B. burgdorferi* sensu lato und hat damit eine wichtige diagnostische Bedeutung. (Bruckbauer et al., 1992). Einige Autoren sprechen ihm eine mögliche Rolle als Marker-Antigen im Spätstadium der Lyme Borreliose zu, da bei Seren von Patienten mit klinischen Anzeichen einer chronischen Borrelieninfektion im Immunblot sehr häufig Antikörperreaktionen auf p83/100 zu beobachten waren (Zöller et al., 1991; Ma et al., 1992). Über die Funktion dieses immundominanten Proteins ist nur wenig bekannt. Es wird angenommen, dass es zur Immunevasion beiträgt (siehe Kapitel 2.2.4). Da es bei Aufreinigungsschritten von Borrelienproteinen oft mit dem flagellenassoziierten p41 in derselben Proteinfraction nachgewiesen wurde, wird davon ausgegangen, dass es in Assoziation zu diesem Protein im Protoplasma-zylinder lokalisiert ist und der Verankerung der Flagellen dient (Volkman et al., 1991).

Neben den oben genannten Proteinen, OspA, OspC und p83/p100 ist auch das 39 kD-Antigen (BmpA) diagnostisch relevant (Simpson et al., 1990). Dieses membranassoziierte und immundominante Protein hat vermutlich eine wichtige Bedeutung für den Metabolismus der Borrelie (Shin et al., 2004) und spielt anscheinend eine bedeutende Rolle bei der Entstehung einer Lyme-Arthritis (Pal et al., 2007).

Das flagellenassoziierte p41-Antigen induziert eine sehr frühe Immunantwort, bis spätestens fünf Wochen nach der Infektion (Berg et al., 1991). Die Bedeutung dieses Proteins für die Diagnostik wird unterschiedlich bewertet. Bruckbauer und Mitarbeiter zählen p41 zu den am besten geeigneten Antigenen für die Serodiagnostik trotz ausgeprägter Kreuzreaktionen mit Rückfallfieber-Borrelien und schwacher Kreuzreaktionen mit anderen verwandten Bakterien wie z. B. Treponemen (Wilske et al., 1990; Bruckbauer et al., 1992). Aufgrund der genannten Kreuzreaktionen schätzen Zöller und Mitarbeiter die diagnostische Relevanz trotz der intensiven Immunantwort gering ein (Zöller et al., 1993). Das auf dem linearen Chromosom lokalisierte, für p41 kodierende Gen wird zur phylogenetischen Differenzierung der Borreliengenospezies genutzt (Fukunaga et al., 1996 b).

Ein weiteres immundominantes Protein stellt das Lipoprotein p17 dar. Das aufgrund seiner Lokalisation auf der Oberfläche der äußeren Membran der Borrelienzelle auch als Osp17 bezeichnete Lipoprotein (auch „Decorin binding protein A“, DbpA oder wegen des nicht einheitlichen Molekulargewichts p18 genannt) ist überwiegend erst zu einem späten Zeitpunkt bei chronischem Infektionsverlauf nachweisbar (Jauris-Heipke et al., 1999).

Ein weiteres outer surface Protein ist das p58. In Immunblotversuchen konnte nachgewiesen werden, dass sich dieses Protein klar von dem nachfolgend beschriebenen p60 abtrennt und als homologes Protein in den drei humanpathogenen Genospezies *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* und *B. garinii* vorkommt (Hauser et al., 1997). Das auch als „common-antigen“ (CA) bezeichnete 60-kD-Protein ist ebenfalls immundominant, eignet sich aufgrund seiner breiten Kreuzreaktivität, z.B. mit *Pseudomonas aeruginosa* und *Treponema pallidum* jedoch nicht zur Diagnostik (Hansen et al., 1988; Bruckbauer et al., 1992).

Tabelle 3: Bezeichnung und Molekulargewicht von Borrelienantigenen

Bezeichnung des Antigens	Molekulargewicht (kDa)
p14	14
p17	17-18
OspE	19,3
p21	21
OspC	22-24
OspF	26,1
OspD	28
p30	30
OspA	31-33
OspB	34-36
p39	39
p41	41
p43	43
p58	58
VlsE p66	66
HSP60, HSP75	60-75
p83/p100	83-100

2.2.4 Pathogenitätsmechanismen

Borrelia burgdorferi verfügt über Mechanismen der Adhäsion, Invasion, Persistenz und Immunevasion, die der Etablierung, Vermehrung und Ausbreitung des Erregers im Wirt dienen. Diesen Eigenschaften ist teilweise auch der eingeschränkte therapeutische Zugang geschuldet. Bis heute sind nicht alle Pathogenitätsmechanismen vollständig aufgeklärt.

Borrelien wandern im Verlauf der Infektion in verschiedene Gewebe des Wirtsorganismus ein, um sogenannte immunprivilegierte Nischen zu besiedeln, wo sie vor dem Angriff des Immunsystems geschützt sind. Dazu zählen Gelenke, Augen und das Zentralnervensystem, da sie extrazelluläre Flüssigkeiten (synoviale und cerebrospinale) beinhalten, die nicht durch die allgemeinen Lymphbahnen zirkulieren (Coyle, 1993; Liang et al., 2002; Embers et al., 2004). Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, dass Borrelien fähig sind, an unterschiedlichen Zelltypen zu haften, wie z.B. Thrombozyten (Coburn et al., 1993), Lymphozyten (Dorward et al., 1997), Fibroblasten (Klempner et al., 1993), epitheliale Zellen (Hechemy et al., 1992) und endotheliale Zellen (Szezepanski et al., 1990). Für die Adhärenz der Spirochäten an die unterschiedlichen Wirtszellen (Greene et al., 1998) scheint das BmpA-Protein eine bedeutende Rolle zu spielen (Verma et al., 2009).

In vitro Studien wiesen eine intrazelluläre Lokalisation von *B. burgdorferi* in verschiedenen Zelltypen wie Endothelzellen (Comstock and Thomas, 1991; Ma et al., 1991), Fibroblasten (Klempner et al., 1993) und Synovialzellen (Girschick et al., 1996) nach. Auch in Muskelzellen und Kollagenfasern von Mäuseherzen konnten mittels Elektronenmikroskopie Spirochäten nachgewiesen werden (Pachner et al., 1995).

Zu den immunevasiven Mechanismen von *B. burgdorferi*, welche die Persistenz im Wirtsorganismus ermöglichen, zählt insbesondere die Fähigkeit zur Antigenvariation. Das VlsE-Antigen enthält dafür neben sechs nicht variable Domänen (IR₁₋₆), von denen IR₆ in Lyme-Borreliose-Patienten immundominant ist (Liang et al., 1999) einen nach außen weisenden hochvariablen Anteil, welcher der Veränderung der Oberflächenstruktur dient.

Scott Hefty und Mitarbeiter führen die Heterogenität der Oberflächenproteine allgemein nicht nur auf temporäre Änderungen der Antigenexpression, sondern auch auf Modulationen der Oberflächenlipoproteine zurück. Sie vermuten, dass Borrelien Regulationmechanismen besitzen, welche die Anordnung der Lipoproteine im Infektionsverlauf zeitlich und räumlich verändern, und damit zu persistierenden Infektionen der Wirte beitragen (Scott Hefty et al., 2002).

Das Protein p83/p100 besitzt dagegen Struktureigenschaften, die denen eukaryotischer Zellen ähneln, so dass ein Imitationseffekt entsteht, welcher ebenfalls zur Immunevasion beiträgt (Rössler et al., 1995).

In Studien an Mäusen entdeckten amerikanische Wissenschaftler, dass Borrelien ein Zeckenspeichelprotein (Salp 15) bei der Infektion der Mäuse nutzen. Über das Oberflächenprotein OspC wird Salp 15 an *B. burgdorferi* gebunden, wodurch ein Schutz vor der Immunabwehr des infizierten Organismus resultiert (Ramamoorthi et al., 2005). Ein weiterer Mechanismus der Immunevasion besteht in der Fähigkeit von *B. burgdorferi*, wirtseigene Komplementregulatoren (FHL-1/reconectin und Factor H) an die Zelloberfläche zu binden (Kraiczy et al., 2001).

Ferner konnte beobachtet werden, dass Borrelien in ungesaugten Zecken OspA produzieren, nicht aber OspC (siehe Kapitel 2.2.3). Während der Infektion von Säugetieren verändert sich aufgrund der veränderten Genexpression die Oberfläche der Borrelien, welche nun OspC und nur wenig oder gar kein OspA enthält (Schwan et al., 1995).

Dorward und Mitarbeiter beobachteten überdies einen zytopathischen Effekt nach der aktiven Invasion von *B. burgdorferi* in B- und T-Lymphozyten, der zur Zerstörung dieser Zellen führte (Dorward et al., 1997).

2.3 Vektor

2.3.1 Taxonomie und Biologie

Die in Mitteleuropa häufigste Zeckenart, *Ixodes ricinus* (siehe Abbildung 2 und Tabelle 4), die im deutschen Sprachgebrauch als „gemeiner Holzbock“ bezeichnet wird, ist zugleich der Hauptüberträger von *B. burgdorferi* s.l. In den USA und im eurasischen Raum sind hingegen *Ixodes scapularis* (vormals *I. dammini*) bzw. *Ixodes persulcatus* die bedeutendsten Vektoren des Erregers der Lyme-Borreliose.



Larve



Nymphe



weibliche Adulte



männliche Adulte

Abbildung 2: Entwicklungsstadien von *Ixodes ricinus*

(Quelle: Archiv des Instituts für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der LMU München)

Tabelle 4: Taxonomie von *Ixodides ricinus*

Stamm	Arthropoda (Gliederfüssler)
Klasse	Arachnida
Ordnung	Acarina (Acari) (Milben)
Familie	Ixodidae (Schildzecken)
Art	<i>Ixodes ricinus</i>

Begründet auf der hohen Anpassungsfähigkeit und Widerstandsfähigkeit gegen wechselhafte Umweltbedingungen (Euryökie) findet *Ixodes ricinus* eine weite Verbreitung, wobei in Deutschland vor allem Nadelwälder, Laub- und Mischwaldbestände mit viel Unterholz und einer dichten Krautzone den Zecken geeignete Habitate bieten. Offene, ausreichend feuchte Gebiete mit Stauden, Farnkraut und Büschen sind auch ohne Baumbestand als Lebensraum geeignet (Liebisch und Liebisch, 2003). Dabei beträgt die benötigte relative Luftfeuchte mindestens 70-80 %. Ab einer Höhenlage von 1.500 Metern über Normalnull werden kaum noch Zecken gefunden.

Die saisonale Aktivität von *Ixodes ricinus* beginnt bei Tagestemperaturen um 10 °C und reicht somit etwa von März bis November. Aktivitätsspitzen wurden bei den adulten Zecken im Frühsommer (April bis Juni) und Herbst (September und Oktober) beobachtet. Dadurch erklärt sich die in der Regel zweigipflige Saisondynamik, die jedoch in Abhängigkeit von den mikroklimatischen Bedingungen auch unimodal verlaufen kann (Kahl, 1994). Im tageszeitlichen Verlauf sind die Zecken wiederum in Abhängigkeit von der Temperatur und Luftfeuchtigkeit besonders in den Morgenstunden sowie am frühen Abend aktiv.

Während ihrer dreijährigen Entwicklungszeit (siehe Abbildung 3) entwickelt sich die achtbeinige adulte Zecke nach dem Schlupf aus dem Ei über ein sechsbeiniges Larven- und ein ebenfalls achtbeiniges Nymphenstadium. Während bei den Larven und Nymphen die Geschlechtsöffnungen fehlen, zeigen die adulten Zecken einen ausgeprägten Geschlechtsdimorphismus. Jedes Zeckenstadium benötigt zur Weiterentwicklung eine Blutmahlzeit. Adulte Zeckenweibchen legen danach schließlich ein Gelege mit 500 bis 3000 Eiern auf dem Boden unter Laub und Gräsern ab und sterben (Rufli und Mumcuoglu, 1981). Alle Entwicklungsstadien leben euryphag, d. h. sie nutzen eine Vielzahl von unterschiedlichen warmblütigen Wirtstieren, wodurch der Übertragungszyklus von *B. burgdorferi* s.l. begünstigt wird (Anderson, 1988; Gern et al., 1998).



Abbildung 3: Entwicklungszyklus von *Ixodes ricinus*

(Quelle: EUCLB (European Concerted Action on Lyme Borreliosis):
The Tick: Life Cycle (2013), URL: <http://www.euclb.com> (Stand: 22.07.2013))

2.3.2 Wirtsfindung und Stechakt

Die Wirtssuchaktivität findet je nach Entwicklungsstadium auf unterschiedlichen Vegetationsebenen statt. Larven bleiben dabei auf die bodennahe Vegetation begrenzt. Nymphen und adulte Zecken steigen auf der Suche nach einem geeigneten Wirt bis zu einer Höhe von ca. 50 cm bzw. bis zu 1 - 1,5 m in der Kraut- und unteren Strauchschicht empor, wo sie an der Spitze von Blättern oder Grashalmen mit abgespreiztem ersten Beinpaar verharren. Mit Hilfe des Haller'schen Organs, welches in einer Sinnesgrube beiderseits an den Tarsen des ersten Beinpaares lokalisiert ist, werden so mechanische, thermische und chemische Reize aufgenommen.

Wird ein Wirt aufgrund der Wahrnehmung einer erhöhten Kohlendioxid- bzw. Ammoniakkonzentration, von Bodenerschütterungen oder Temperaturerhöhungen geortet, klammert sich die Zecke beim Vorbeistreifen des Wirts an diesem fest bzw. lässt sich auf diesen fallen (Sonenshine, 1991; Liebisch und Liebisch, 2003; Eckert et al., 2008). Nach dem Aufsuchen einer geeigneten Stichstelle - beim Tier oft fein behaarte bzw. haarlose Körperregionen mit vergleichsweise dünner Haut - wird die Haut mit Hilfe der paarigen Cheliceren aufgeritzt und das mit Widerhaken besetzte Stechorgan (Hypostom) in die gesetzte Wunde versenkt (Jettmar, 1957; Ruffli und Mumcuoglu, 1981; Kahl 1994; Stanek und Hofmann, 1994). Der Halteapparat, mit dem sich die Zecke während des Saugaktes fest im Wirt verankert, besteht aus den Cheliceren, dem mit einer Reihe von Widerhaken besetzten Hypostom sowie der sogenannten Zementsubstanz, die in den Speicheldrüsen gebildet und über das Hypostom abgesondert wird. Mittels dieser schnell härtenden Substanz wird das Hypostom mit den Wundrändern verkittet.

Aufgrund der mit dem Zeckenspeichel in die Stichwunde abgesonderten lokal anästhetischen und antiinflammatorischen Komponenten werden Zeckenstiche oft spät oder gar nicht bemerkt (Ruffli und Mumcuoglu, 1981). Vom Befall des Wirtes bis zum Stechakt können bis zu 12 Stunden vergehen. Die Dauer des Saugaktes ist vom Entwicklungsstadium der Zecke abhängig. So saugen Nymphen vier bis sechs Tage und adulte Zecken sechs bis acht Tage. Weibliche Adulte sind dabei in der Lage, das 100 – bis 200-fache ihres Körpergewichtes aufzunehmen. In der ersten Phase des Saugvorganges kommt es zu intensiven Wachstumsvorgängen an Kuticula und Mitteldarmepithel, welche zusätzlich in den letzten 12 bis 24 Stunden gedehnt werden (Mehlhorn und Piekarski, 1998; Eckert et al., 2008).

2.3.3 Übertragung

Während des Saugaktes an einem infizierten Wirt werden Borrelien mit der Körperflüssigkeit aufgenommen. Eine Vermehrung der Erreger findet im Mitteldarm der Zecke statt, wo sie auch persistieren. Das nächste Entwicklungsstadium der Zecke überträgt die Borrelien wiederum beim Saugvorgang auf einen neuen Wirt. Um mit dem Zeckenspeichel in das Gewebe des Wirtes gelangen zu können, passieren die Borrelien vor der Übertragung im Verlauf des Saugaktes die Darmwand und wandern über die Hämolymphe in die Speicheldrüse ein (Piesman et al., 2001). Einen zweiten Mechanismus der Erregerübertragung stellt die Regurgitation von Mitteldarmsekret der Zecke in die Stichwunde dar (Burgdorfer, 1984; Burgdorfer et al., 1989).

Obwohl neben der horizontalen Übertragung auch die Möglichkeit der transovariellen Übertragung postuliert wurde (Kahl, 1991; Zhioua et al., 1994; Wolf, 1996), scheint dies neueren Erkenntnissen zufolge nicht bzw. nur zu einem geringen Prozentsatz vorzukommen, die Studien zu diesem Thema wurden an *Ixodes persulcatus* durchgeführt (Nefedova et al., 2004).

2.3.4 Reservoirwirte

Ixodes ricinus weist eine sehr geringe Wirtsspezifität auf, wobei über 300 Reptilien-, Vogel- und Säugetierarten parasitiert werden. Die drei Entwicklungsstadien der Zecke sind nach ihrem jeweiligen Aktionsradius gehäuft an unterschiedlichen Wirtstiergruppen zu finden: Larven sind oft an Kleinsäugetern zu finden, die sich dichter am Boden aufhalten. Dazu zählen in Mitteleuropa vor allem die Gelbhalsmaus (*Apodemus flavicollis*), die Waldmaus (*Apodemus sylvaticus*) die Rötelmaus (*Clethrionomys glareolus*), sowie andere Maus- und Spitzmausarten (Huegli et al., 2002; Hanincova et al., 2003).

Auch an Eidechsen kann man Larven von *Ixodes ricinus* entdecken. Nymphen werden ferner auf etwas größeren Säugern, wie Eichhörnchen (*Sciurus vulgaris*), Marder (*Mustelidae*) und Igel (*Erinaceus europaeus*) sowie auf Vögeln, die sich häufiger in Bodennähe aufhalten, gefunden. Hierunter zählen besonders größere Vogelarten wie z.B. Amsel (*Turdus merula*), Singdrossel (*Turdus philomelos*) und Eichelhäher (*Garrulus glandarius*) (Walter und Liebisch, 1980). Wie die adulten Zecken parasitieren aber auch Nymphen an diversen größeren Wildtieren, in silvatischen Gebieten vorwiegend beim Rehwild (*Capreolus capreolus*) und Rotwild (*Cervus elaphus*). Mensch und Haustiere werden ebenfalls von den beiden letztgenannten Entwicklungsstadien befallen (Gray et al., 1999; Eckert et al., 2008).

Die Lyme Borreliose ist eine typische Naturherdinfektion: *B. burgdorferi* zirkuliert zwischen dem Vektor und den Wildtieren als Reservoirwirte. Für Mensch und Haustier nimmt das Risiko einer Infektion mit der Häufigkeit des Kontakts zum Habitat des Vektors bzw. Reservoirs zu. Davon sind neben Haustieren mit Weidehaltung aufgrund der großflächigen Überschneidung der Lebensräume auch Menschen und Haustiere im urbanen Raum betroffen, wohin viele der o.g. Reservoirwirte ihre Habitate ausgedehnt haben.

2.4 Lyme-Borreliose

2.4.1 Geographische Verbreitung/Epidemiologie

Die Lyme-Borreliose ist die am häufigsten durch Zecken übertragene Infektionskrankheit auf der nördlichen Hemisphäre. Das Vorkommen der Lyme-Borreliose in Europa deckt sich mit dem Verbreitungsgebiet von *Ixodes ricinus* und *Ixodes persulcatus* (Osteuropa), in den USA und in Asien mit dem Verbreitungsgebiet des Vektors *Ixodes scapularis* bzw. *Ixodes persulcatus* (siehe Abbildung 4).

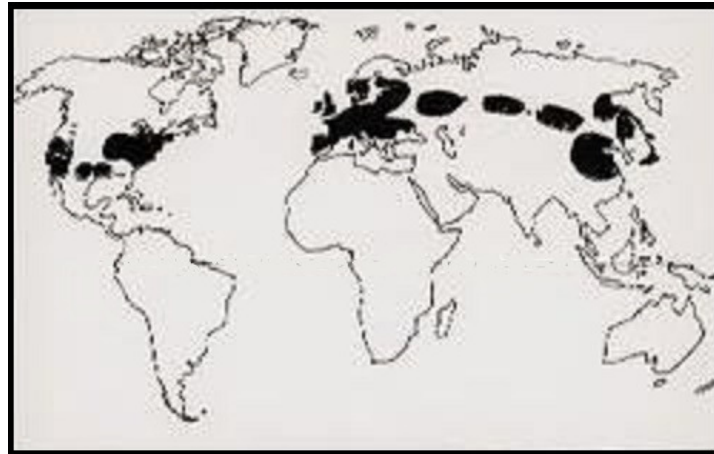


Abbildung 4: Verbreitung der Lyme-Borreliose in der Welt

(Quelle: Fingerle, Nationales Referenzzentrum Borrelien, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (2008),

URL:http://www.lgl.bayern.de/gesundheit/infektionsschutz/infektionskrankheiten_a_z/borreliose/lyme_epidemiologie.htm (Stand: 22.07.2013))

Laut dem Robert-Koch-Institut ist von einer Infektionsgefährdung in allen Teilen Deutschlands auszugehen, allerdings fehlen flächendeckende epidemiologische Untersuchungen deutschlandweit wird die Prävalenz von *B. burgdorferi* s.l. in Zecken auf 5 – 35 % geschätzt. Dabei sind durchschnittlich etwa 20 % der adulten Zecken, etwa 10 % der Nymphen und bis zu 1 % der Larven mit Borrelien infiziert (Quelle: Robert-Koch-Institut (2013), URL:

http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_LymeBorreliose.html?nn=2374512#doc2398672bodyText2 (Stand: 22.07.2013)).

Zur Inzidenz der Lyme-Borreliose des Menschen gibt es in Deutschland nur grobe Schätzungen, da bislang nur in Berlin, Brandenburg, Mecklenburg-Vorpommern, Rheinland-Pfalz, Saarland, Sachsen, Sachsen-Anhalt und Thüringen eine Meldepflicht auf der Basis von Länderverordnungen besteht. Meldepflichtige Manifestationen der Lyme-Borreliose sind das *Erythema migrans*, die frühe Neuroborreliose und die akute Lyme-Arthritis. In 2009 betrug die jährliche Inzidenz in den neuen Bundesländern 34,7 Meldefälle pro 100.000 Einwohner. Ergebnisse von zwei bevölkerungsbezogenen prospektiven Kohortenstudien in Süddeutschland zeigten Jahresinzidenzen zwischen 111 und 260 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner (Hassler et al., 1992; Huppertz et al., 1999). Die Zahl der Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland wird auf 50.000 bis 100.000 geschätzt

(Quelle: Robert-Koch-Institut (2012),

URL:http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2012/Ausgaben/14_12.pdf?blob=publicationFile (Stand: 22.07.2013)).

Laut dem Nationalen Referenzzentrum für Borrelien gibt es auch für Europa kaum offizielle Zahlen zur Häufigkeit des Auftretens der Lyme-Borreliose, da nur in einigen Staaten Meldepflicht für diese Zoonose besteht. Schätzungen der Inzidenz liegen bei 16 bis 140 pro 100.000 Einwohner (Quelle: Fingerle, Nationales Referenzzentrum Borrelien, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (2008), URL: http://www.lgl.bayern.de/gesundheitschutz/infektionsschutz/infektionskrankheiten_a_z/borreliose/lyme_epidemiologie.htm (Stand: 22.07.2013)).

2.4.2 Lyme-Borreliose des Menschen

2.4.2.1 Krankheitsverlauf

Unter dem Begriff Lyme-Borreliose werden gemäß der Festlegung, die im Jahr 1985 in Wien auf dem „Second International Symposium on Lyme Disease and Related Disorders“ getroffen wurde, alle durch Infektionen mit *B. burgdorferi* s.l. verursachten klinischen Manifestationen des Menschen subsumiert. Demnach ist die Lyme-Borreliose des Menschen eine multisystemische Erkrankung, welche Verläufe einer milden Lokalinfektion bis hin zu einer chronisch-persistierenden oder progredienten Infektion nehmen kann.

Überwiegend manifestiert sich die Erkrankung als lokalisierte Hautinfektion (*Erythema migrans*). Der Infektionszeitpunkt ist oft schwer zu bestimmen, weil sich die Patienten nicht an einen Zeckenstich erinnern können, oder die klinischen Symptome zunächst nicht mit einer Lyme-Borreliose in Verbindung gebracht werden. Die Angaben zur Inkubationszeit fallen dementsprechend unterschiedlich aus. Es können Tage oder auch Jahre vergehen, bis die ersten Anzeichen einer Borrelien-Infektion auftreten (Christen, 1987).

Beim Menschen lässt sich der Krankheitsverlauf prinzipiell in drei Stadien (siehe Tabelle 5) einteilen, die weder von jedem Patienten durchlaufen werden, noch eindeutig voneinander abgrenzbar sind (Steere, 1989). Die frühen Manifestationen der Lyme-Borreliose, wie das *Erythema migrans* oder die akute Neuroborreliose, werden analog zur Zeckenaktivität am häufigsten von Frühsommer bis Herbst beobachtet; Spätmanifestationen der Lyme-Borreliose weisen keine saisonalen Prävalenz-Schwankungen auf (Fingerle, 2008).

Tabelle 5: Stadien des Krankheitsverlaufs beim Menschen

Stadium I:	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tage bis Wochen nach Zeckenstich ▪ Gekennzeichnet durch das <i>Erythema migrans</i>, die sogenannte „Wanderröte“ (ca. 50% der infizierten Personen) ▪ Konzentrische Ausbreitung einer Hautrötung um die Zecken-Einstichstelle herum ▪ Lokale Infektion ▪ Gelegentlich begleitet von Fieber und grippalen Symptomen ▪ Selten: Lymphadenosis cutis benigna (LCB)
Stadium II:	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Wochen bis Monate nach Zeckenstich ▪ Neurologische Symptome: aseptische Meningitis, Enzephalitis, Hirnnervenlähmungen (v.a. Fazialisparesen), Radikuloneuropathien, Meningo-Polyneuritis (Bannwarth-Syndrom) ▪ Kardiologische Symptome: Endo-, Myo-, Peri-, Pankarditis (Reizleitungsstörungen) ▪ Rheumatologische Symptome: Arthritiden, Gelenk- und Muskelschmerzen
Stadium III:	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Chronische Form, Monate bis Jahre nach Zeckenstich ▪ Überwiegend chronisch-rezidivierende Gelenkentzündungen (Knie- (80%), Sprung- und Handgelenke) ▪ Chronische Hautform: Acrodermatitis chronica atrophicans (Haut dünn und gefältelt mit durchscheinenden Gefäßen) ▪ Progressive Enzephalomyelitis ▪ Selten kardiologische Manifestationen

(Steere et al., 1986)

2.4.2.2 Immunantwort

Etwa zwei bis vier Wochen nach der Erstinfektion sind Antikörper der Klasse IgM (IgM) in nachweisbaren Konzentrationen vorhanden, deren Maximum ungefähr nach sechs bis acht Wochen erreicht wird, um dann allmählich wieder abzufallen; Antikörper der Klasse IgG (IgG) sind erst nach sechs bis acht Wochen nachweisbar (Craft et al., 1984; Christen et al., 1993; Frey and Rao, 1995). In manchen Fällen sind IgM auch über längere Zeit nachweisbar, wodurch Rückschlüsse auf den ungefähren Infektionszeitpunkt erschwert werden. Die IgG-Konzentration kann hingegen über Monate bis Jahre bei fortschreitender Erkrankung langsam bis zum Erreichen eines Plateauwerts ansteigen und dann relativ konstant bleiben (Dattwyler and Luft 1989).

Eine Unterscheidung zwischen einer klinisch manifesten und einer überstandenen Borrelien-Infektion ist aufgrund eines positiven IgG-Nachweises jedoch nicht möglich. Dagegen kann im Fall eines ausschließlichen Nachweises von IgM eine chronische Lyme-Borreliose nahezu ausgeschlossen werden (Fingerle, 2008).

Findet eine erneute Auseinandersetzung mit dem Erreger statt, steigt die IgG-Konzentration schnell an, während IgM in der Regel nicht nachweisbar sind. Rückschlüsse hinsichtlich des Infektionszeit-

punktes sind damit nicht möglich. In seltenen Fällen sind auch bei klinischer Erkrankung an Lyme-Borreliose keine Antikörper nachweisbar. (Wilske et al., 1991).

Dejmkova und Mitarbeiter schilderten einen Fall von seronegativer Lyme-Arthritis verursacht durch *B. garinii*, bei dem die klinischen Befunde und der direkte Erregernachweis (DNA von *B. garinii*) im Blut und in der Synovialflüssigkeit eine eindeutige Diagnose erbrachten (Dejmkova et al., 2002).

2.4.3 Lyme-Borreliose des Pferdes

Aufgrund des mehrheitlich intensiven Kontaktes zur Vegetation unterliegen Pferde prinzipiell einer höheren Zeckenexposition und sind damit gleichzeitig einem größeren Infektionsdruck gegenüber Borrelien ausgesetzt als der Mensch. Über die Verbreitung und insbesondere das klinische Bild der Lyme-Borreliose beim Pferd gibt es bislang jedoch vergleichsweise wenige Erkenntnisse (Divers, 2013). Weder scheinen die beim Menschen definierten Krankheitsstadien auf das Pferd übertragbar, noch wurde ein entsprechendes Krankheitsbild beim Pferd beschrieben.

2.4.3.1 Fallberichte mit Bestätigung durch direkte Nachweismethoden

Die seit dem Jahr 1986 publizierten Beschreibungen klinischer Erkrankungen an vermuteter Lyme-Borreliose beim Pferd, die mit einem direkten Nachweis von *B. burgdorferi* s. l. einhergingen, beschränken sich bis heute auf einige wenige Fälle, die nachfolgend dargestellt werden.

Fall 1:

Im Jahr 1985 wurde in Wisconsin, USA, ein 12-jähriges Pony aufgrund chronischer, mit bilateraler Karpalgelenkschwellung einhergehender Lahmheit und Corneatrübung vorgestellt. Als Ursache für die seit sechs Monaten bestehende rezidivierende Lahmheit wurde eine schwere degenerative Karpalgelenkentzündung diagnostiziert. Der Augenbefund umfasste eine ulzerative Keratitis, ein generalisiertes Corneaödem, eine Konjunktivitis und eine Uveitis, betroffen war dabei vor allem das linke Auge. Sowohl Serum- als auch Synoviaprobe der Karpalgelenke wurden mittels IFAT positiv auf *B. burgdorferi* getestet mit Antikörpertitern von 1:1024. Nach der Euthanasie des Tieres wurden Proben des Augenkammerwassers entnommen und sowohl serologisch (IFAT) als auch bakteriologisch (Kultur) mit negativem Ergebnis auf Borrelien untersucht. Mikroskopisch konnten in der vorderen Kammer des linken Auges Spirochäten nachgewiesen werden, die mittels direkter Immunfluoreszenz als *B. burgdorferi* identifiziert wurden. Aus dem Blut und der Synovia des Tieres konnten keine Borrelien kultiviert werden. Unter Berücksichtigung der klinischen und serologischen (IFAT) Untersuchungsergebnisse und aufgrund des direkten Erregernachweises im linken Auge des Ponys wurde abschließend die Diagnose „Lyme-Borreliose“ gestellt (Burgess et al., 1986).

Fall 2:

Im Jahr 1986 wurde – ebenfalls bei einem Pferd aus Wisconsin, USA – erstmals eine Borrelieninfektion in Verbindung mit neurologischen Symptomen diagnostiziert. Die Beschreibung des Falles erfolgte wiederum durch Burgess und Mitarbeiter (Burgess and Mattison, 1987). Demnach traten bei einem sechsjährigen Wallach Anzeichen einer progressiven Enzephalitis auf, die sich durch Kopfschiefhaltung, Schweiflähme, Dysphagie und ständiges Umherlaufen äußerten. Eine Woche nach Erkrankungsbeginn wurde das Pferd euthanasiert. Tollwut und weitere Virusinfektionen wurden labor diagnostisch ausgeschlossen. Der mittels IFAT durchgeführte Antikörpernachweis gegen *B. burgdorferi* war positiv mit einem Antikörpertiter von 1:2048. Durch Anzüchtung in einem modifizierten Kelly-Medium konnten Spirochäten aus dem Hirngewebe isoliert werden. Der nachfolgende

direkte Immunfluoreszenztest (DIFT) erbrachte den Nachweis von Borrelien aus dem Gehirn (Burgess and Mattison, 1987).

Fall 3:

Anhand eines weiteren Experiments von Burgess und Mitarbeitern mit sieben tragenden Stuten, die absichtlich einer erhöhten Zeckenexposition in einem hoch endemischen Borreliosegebiet (Wisconsin) ausgesetzt wurden, konnte angeblich die Möglichkeit einer intrauterinen Infektion bewiesen werden. Die Stuten wiesen über den gesamten Studienzeitraum von 1,5 Jahren Antikörper gegen *B. burgdorferi* im Blut auf (IFAT), zwei der Stuten abortierten oder resorbierten ihren Fötus, drei Fohlen starben kurz nach der Geburt und nur zwei Fohlen überlebten. Eines dieser beiden Fohlen musste jedoch einjährig aufgrund von neurologischen Symptomen euthanasiert werden, das Kolostrum der Mutter wies einen Antikörpertiter im IFAT gegen *B. burgdorferi* von 1:256 auf. Bei zwei der drei toten Fohlen konnte *B. burgdorferi* aus den Nieren, bei einem aus dem Gehirn isoliert werden (Burgess et al., 1990).

Fall 4:

Zehn Jahre nach dem ersten Fallbericht aus den USA (siehe Fall 1) wurde erstmalig bei einem Pferd in Europa mittels PCR eine mögliche klinisch manifeste Borreliose bestätigt (Hahn et al., 1996). Im Jahr 1996 erkrankte eine neunjährige Stute aus dem Vereinigten Königreich, die gemäß der Anamnese seit über drei Wochen Lethargie, Anorexie, Fieber und Ataxie mit zwischenzeitlicher Hyperaesthesie des Kopfes zeigte. Trotz mehrerer unterschiedlicher Therapien mit kurzfristiger Besserung verschlechterte sich der Zustand des Tieres laufend. Zu den anfänglichen Symptomen kamen Arthritis der Karpalgelenke, Füllung der Sehnenscheiden, akute Uveitis, Hypersensitivität der Beckengliedmaße und der Perinealregion, stereotypes Umherlaufen und Depression bis zum Stupor hinzu. Schließlich wurde die Stute unter plötzlich auftretenden Exzitationen euthanasiert. Mit Ausnahme des Augenkammerwassers war bei allen post mortem entnommenen Gewebeproben aus Leber, Milz, Lunge, Gehirn, Haut und Synovialmembran der Borrelien-Nachweis mittels PCR (Livesley et al., 1994) positiv (Hahn et al., 1996).

Fall 5 - 8:

Im Rahmen einer seroepidemiologischen Studie, bei der Proben von 1.492 Pferden aus einem Endemiegebiet in Süddeutschland mit dem Ergebnis einer Seroprävalenz von 47,9 % auf Borrelien untersucht worden waren, fand auch eine Untersuchung von vier klinischen Verdachtsfällen statt (Liebisch et al., 1999):

Zuerst wurde ein zehnjähriger Oldenburger Wallach mit Kachexie, Polyarthritis, Endokarditis und später Somnolenz beschrieben. Sechs in etwa halbjährigem Abstand durchgeführte Serumuntersuchungen dieses Wallachs im IFAT waren jeweils mit einem Titer von 1:512 positiv. Auch der Immunblot wurde positiv bewertet. Die Untersuchungen von Gelenkpunktaten ergaben wiederholt positive Ergebnisse mit einem Antikörpertiter von 1:128 und es konnten mittels Kultivierung Borrelien isoliert werden. Auch aus Hautbiopsien, die im gleichen Zeitraum genommen wurden, ließen sich bei neun von zehn Proben im BSK II-Medium Borrelien anzüchten. Liquorpunktate und Harn waren dagegen in den Kulturen negativ. Post mortem gelang die Borrelien-Isolierung aus weiteren Hautbiopsien, sowie aus Gewebeproben von Sklera, Retina, Cornealschleimhaut, fünf verschiedenen Lymphknoten, Lunge, Leber und Milz.

Ein sechsjähriger Wallach aus dem gleichen Bestand war ebenfalls erkrankt. Die bei ihm erhobenen klinischen Befunde entsprachen weitestgehend denen des zuvor beschriebenen Falles. Zwei im Abstand von drei Wochen untersuchte Serumproben ergaben im IFAT von 1:64 auf 1:128 ansteigende Antikörpertiter.

Bei einer 13-jährigen Vorarlberger Stute mit beidseitiger chronischer Keratitis war die Untersuchung mittels IFAT ebenfalls positiv mit einem Antikörpertiter von 1:128. Borrelien wurden aus Proben der Konjunktivalschleimhaut und der Haut kultiviert und isoliert.

Ferner wurden auch aus Hautbiopsien einer 18-jährigen Stute mit sarkoiden Hautveränderungen und diffuser Hyperkeratose wiederholt Borrelien isoliert. Die Ergebnisse mehrfacher im Verlaufe eines Jahres mittels IFAT durchgeführter Untersuchungen waren ebenfalls positiv, wobei Antikörpertiter zwischen 1:64 bis 1:1024 bestimmt wurden. Die post mortem durchgeführte Isolierung von Borrelien aus Gewebeproben von Lunge, Niere, Leber, Retina und Großhirn soll teilweise schon nach 24 Stunden gelungen sein.

Liebisch und Mitarbeiter publizierten darüber hinaus die gelungene Isolierung von *B. afzelii* aus der Milz eines Pferdes. Nach experimenteller Infektion von Mäusen mit diesem Isolat wurde *B. afzelii* nachfolgend wiederum aus dem Gelenkpunktat der Mäuse reisoliert (Liebisch et al., 2002).

Fall 9:

Im Jahr 2001 wurde ein fünfjähriger Shetlandponywallach in der Klinik für Pferdekrankheiten der FU Berlin aufgrund neurologischer Symptome (Ataxien) vorgestellt. Nach einer deutlichen Zustandsverschlechterung wurde das Tier euthanasiert und pathologisch-anatomisch untersucht. Neben dem Hauptbefund der Meningitis und Enzephalomyelitis wurde nebenbefundlich eine Glomerulonephritis festgestellt. Im Rahmen der Dissertation von Schönert (2004) wurden verschiedene Proben des Ponys mit direkten und indirekten Nachweisverfahren auf Borrelien untersucht. Bei den serologischen Untersuchungen kamen drei verschiedene ELISA-Testsysteme und ein IFAT zum Einsatz. Beim ELISA fungierte *B. afzelii* (ELISA A), *B. burgdorferi* s.s. (ELISA B) bzw. *B. garinii* (ELISA C), und beim IFAT *B. garinii* als Testantigen. Der Antikörpernachweis aus Serumproben war mit allen Testsystemen negativ. Bei einer Liquorprobe war der Antikörpernachweis mit dem *B. garinii*-spezifischen ELISA-Test positiv. Für den direkten Erregernachweis wurden Haut-, Liquor-, Synovia- und Vollblutproben mittels Kultur, semi-nested PCR (Zielgen *OspA*) und Real-Time PCR untersucht. Die Ergebnisse beider Nachweisverfahren waren negativ. Bei der retrospektiven Untersuchung mittels Real-time PCR, konventioneller PCR und semi-nested PCR mit verschiedenen Primerpaaren und Zielsequenzen (Flagellin, Recombinase A, *OspA*) war die Liquorprobe wiederholt positiv. Die Sequenzierung der Amplifikate erbrachte die höchste Sequenzhomologie mit *B. afzelii*. Die mit dem positiven Nachweis von Borreliengensequenzen unvereinbaren negativen serologischen Untersuchungsbefunde wurden mit der Fähigkeit der Borrelien zur Immunevasion (siehe Kapitel 2.2.4.) erklärt (Grabner et al., 2008).

Fall 10:

James und Mitarbeiter berichteten 2010 vom Fall eines Englischen Vollblutes, dass wegen Nackensteifheit und Leistungsabfall tierärztlich vorgestellt wurde (James et al., 2010). In der Cerebrospinalflüssigkeit konnte mittels PCR die DNA von *B. burgdorferi* identifiziert werden. Nachdem das Pferd zunächst gut auf eine Doxycyclinthherapie ansprach, verschlechterte sich der Zustand rapid. Aufgrund von heftigen Ataxien und Gleichgewichtsstörungen wurde es schließlich euthanasiert. Post mortem konnte eine Leptomeningitis, eine lymphohistiozytische leptomeningeale Vaskulitis, eine kraniale Neuritis und eine periphere Radikuloneuritis festgestellt werden, was zu der Diagnose Neuroborreliose führte (James et al., 2010).

Fall 11 und 12:

Zwei Fallberichte von Pferden mit Neuroborreliose wurden im Jahr 2011 publiziert (Imai et al., 2011). Der erste Fall betraf einen 9-jährigen Wallach, der über den Zeitraum eines Jahres Anzeichen einer fortschreitenden neurologischen Erkrankung zeigte. Als die Symptome erstmalig auftraten, befand sich das Pferd in einem Stall in New Jersey. Der Wallach zeigte Schmerzen im Hals- und Rückenbereich mit Hyperästhesie des Lendenbereichs, Lethargie, Inappetenz und Gewichtsabnahme. Darauf-

hin wurde eine serologische Untersuchung auf Lyme-Borreliose dreimalig über neun Monate in zwei verschiedenen Labors veranlasst. Die Ergebnisse fielen allesamt negativ aus. Fünf Monate, nach dem Auftreten der ersten klinischen Anzeichen entwickelte das Pferd eine einseitige Konjunktivitis und Uveitis. Zehn Monate später waren ferner fortschreitende Ataxie, Fazialparese, Hypermetrie der Vorderextremitäten und propriozeptive Defizite (Zirkumduktion, Beeinträchtigung der Hintergliedmaßen) feststellbar, außerdem zeigte der Wallach weiterhin Schmerzen im Lendenbereich. Aufgrund der neurologischen Anzeichen und dem serologischen Nachweis von *Sarcocystis neurona* wurde eine Behandlung auf Equine Protozoal Myeloencephalitis (EPM) durchgeführt. Der Erfolg war fragwürdig. Die klinischen Anzeichen verschlimmerten sich weiterhin, außerdem entwickelte das Pferd abnorme Verhaltensweisen. Nachdem es schließlich zum Festliegen kam, wurde es euthanasiert.

Der zweite Fall betraf eine 18-jährige Quarterhorsestute, bei der über vier Jahre episodische Muskelatrophien in diversen Muskelpartien auftraten, die mit einer milden Hyperästhesie und einer Beeinträchtigung in der Bewegung einhergingen. Das Pferd stammte aus Kalifornien und wurde in einem Waldgebiet geritten. Aufgrund der klinischen Anzeichen und einer nicht eindeutig seropositiven Cerebrospinalflüssigkeitsprobe, die auf *Sarcocystis neurona* getestet wurde, behandelte man die Stute ebenfalls – erfolglos – auf Equine Protozoal Myeloencephalitis. Im dritten Jahr der Erkrankung wurde bei dem Pferd eine periphere Neuropathie festgestellt, mehrere Muskelpartien, vor allem im linken Brust- und Lendenwirbelsäulenbereich waren atrophiert. Auch wurde linksseitig eine periphere faziale Neuropathie diagnostiziert. Nach einer mehrmonatigen Dexamethasontherapie konnte ein vollständiger Wiederaufbau der Muskeln beobachtet werden. Infolge einer Hufrehe wurde die Therapie nach sechs Monaten eingestellt und die Muskeln atrophierten erneut. Im vierten Jahr schritt die Erkrankung weiter fort und die Stute wurde schließlich aufgrund von Ataxie, Inkoordination und Benommenheit euthanasiert.

In beiden Fällen wurden im Zuge histopathologischer Untersuchungen Spirochäten in den Leptomeningen und der Dura mater des Großhirns und des Rückenmarks identifiziert. Eine quantitative PCR erbrachte beim ersten Fall den Nachweis von Borrelien DNA aus Gewebeproben von Pleura, Lunge, Gehirn, Rückenmark, Muskeln und Gelenkkapseln. Es wurden dabei pro Gewebetyp mindestens zwei der für *B. burgdorferi* s.s. spezifischen Zielgene amplifiziert. Diese umfassten OspA, OspC, Flagellin, DbpA und BmpA. Am häufigsten wurden Flagellin und OspC detektiert, vornehmlich in Proben von Rückenmark, Muskeln und Gelenkkapseln. Aus der Gewebeprobe des Rückenmarks von Fall 2 konnte keine borrelienspezifischen Gensequenzen amplifiziert werden. Laut der Autoren handelt es sich im ersten Fall wahrscheinlich um eine Neuroborreliose im frühen und im zweiten Fall im späten Stadium (Imai et al., 2011).

Fall 13 und 14:

Aus dem Jahr 2012 stammen zwei Fallberichte, die von Priest und Mitarbeitern veröffentlicht wurden (Priest et al., 2012). Dabei handelte es sich um zwei Pferde mit bilateraler Uveitis. Die zytologische Untersuchung des Glaskörpers erbrachte den Nachweis von Spirochäten, die mittels PCR als *B. burgdorferi* identifiziert wurden. Eines der beiden Pferde wies zudem eine chronische multifokale lymphohistiozytische Ganglioradikulitis und Neuritis in den Spinalnerven auf (Priest et al., 2012).

Fall 15:

Sears und Mitarbeiter berichteten von einem 10-jährigen Pferd, dass multiple Hautknötchen in der Masseterregion entwickelte, drei Monate zuvor wurde an dieser Stelle eine Zecke entfernt (Sears et al., 2012). Ein positiver serologischer Test und die ebenfalls positive PCR eines Papelbiopsats auf *B. burgdorferi* in Verbindung mit der klinischen Historie und dem Ansprechen auf eine Doxycyclin-Therapie erhärtete die Diagnose auf ein Borrelien assoziiertes kutanes Pseudolymphon (Sears et al., 2012).

2.4.3.2 Seroepidemiologische Studien

Neben den oben beschriebenen Fällen, wurde bei verschiedenen seroepidemiologischen Studien (siehe Tabelle 6) ein Zusammenhang zwischen dem positiven Nachweis von Antikörpern gegen Borrelien und dem Vorliegen bestimmter klinischer Symptome (siehe Kapitel 2.4.3.1), die auf eine Erkrankung der Pferde an Lyme-Borreliose zurückgeführt wurde, hergestellt.

Im Jahr 1988 veröffentlichte Burgess Untersuchungsergebnisse von insgesamt 190 Pferdeserumproben, die mittels IFAT auf IgG-Antikörper gegen *B. burgdorferi* untersucht wurden. Die Proben stammten von Pferden aus unterschiedlichen Regionen des US-Bundesstaates Wisconsin und wurden von über hundert Veterinärkliniken über den Zeitraum eines Jahres, von Juli 1986 bis Juni 1987, eingesandt. Von den 190 untersuchten Serumproben waren 118 positiv mit einem Antikörpertiter von 1:128 oder höher. Bei 83 dieser Pferde wurden vorberichtlich klinische Veränderungen festgestellt, die als Hinweis auf eine Borrelien-Infektion gewertet wurden (Burgess, 1988). Dazu zählten Lahmheit oder Steifheit (47), Hufrehe (8), geschwollene Gelenke (7), Lethargie einhergehend mit Fieber (6) und Kachexie (8). Nur zehn von den 83 Pferden waren augenscheinlich gesund. Die höchsten Antikörpertiter wurden im Mai und Oktober ermittelt. In diesen Monaten, die den saisonalen Höhepunkten der Abundanz adulter Zecken entsprechen, wurden auch die meisten klinischen Fälle beobachtet (Burgess, 1988).

Lindenmayer und Mitarbeiter (1989) verfolgten das Thema der vorangegangenen Studie von Burgess (1988) weiter. Mittels IFAT, wurden in den Jahren 1987 und 1988 genommene Serumproben von Pferden aus Massachusetts untersucht. Im ersten Jahr wurden von 19 Proben 14 (74 %), im zweiten Jahr von 61 Proben 46 (75 %) positiv getestet. Dabei wurden jedoch die meisten positiven Ergebnisse, der Grenzwert wurde bei 1:128 festgelegt, jeweils im Zeitraum von Juli bis Oktober ermittelt – also in der Jahreszeit, in der insbesondere die Nymphenstadien der Zecken aktiv sein sollen (Lindenmayer et al., 1989).

Im Rahmen serologischer Untersuchungen im US-Bundesstaat New Jersey fielen bei Fohlen gehäuft Ödeme und Dermatitis an den Gliedmaßen auf. In einigen Fällen traten in der Folge Arthritis auf, die mit einer Lyme-Borreliose in Verbindung gebracht wurde. Cohen und Mitarbeiter untersuchten mittels ELISA 59 Jährlinge eines Gestüts im März, Juli und September des Jahres 1986 auf Antikörper gegen *B. burgdorferi*. Im März wiesen 59,3 % der jungen Pferde ein positives Ergebnis auf, im Juli 47,8 % und im September 35,9 %. Dabei wurde zwischen „hochpositiven“ und „positiven“ Resultaten unterschieden. Bei der Mehrheit der Pferde (34 %) wurde ein Abfall des Antikörpertiters in diesem Zeitraum beobachtet und nur bei 5 – 7 % erfolgte trotz der weiterhin bestehenden Zeckenexposition und der damit verbundenen potentiellen Reinfektion eine Erhöhung. Des Weiteren wurden 115 Stuten und 6 Hengste ebenfalls mittels ELISA auf Antikörper gegen *B. burgdorferi* untersucht. Das Untersuchungsergebnis war bei 60 % der Stuten und 66,7 % der Hengste positiv (Cohen et al., 1988).

Bei 9 von 86 Pferden aus Endemiegebieten in Lyme, Connecticut bzw. Westchester County, New York mit positiven Untersuchungsergebnissen im IFAT mit Antikörpertitern zwischen 1:64 und 1:1024 wurden klinische Erscheinungen beobachtet, als deren Ursache eine Lyme-Borreliose vermutet wurde. Die Symptome umfassten hier Lethargie, leichtes Fieber (38,6 °C bis 39,1 °C), einzelne oder multiple schmerzhaft geringgradige Gelenkschwellungen, die zu Lahmheit oder Steifheit führten. Bei vier Pferden wurde eine Hypersensitivität der Haut, begleitet von erhöhter Schmerzempfindlichkeit der darunter liegenden Muskeln, festgestellt. Drei davon wiesen lokalisierten Haarverlust und schuppige Haut im Bereich der Gelenke auf, an denen vorher Zecken beobachtet worden waren (Magnaelli et al., 1988).

Im Jahr 1993 stellten Browning und Mitarbeiter eine mögliche Assoziation zwischen unerklärbaren Lahmheiten und Borrelien-Infektionen her. Vergleichende Untersuchungen von Pferden in Endemiegebieten des Vereinigten Königreichs mittels ELISA, bei dem als Antigen *B. burgdorferi* s.s. (Stamm B31) verwendet wurde, erbrachten signifikante Unterschiede der Seroprävalenz von klinisch unauffälligen Pferden im Vergleich zu solchen mit unerklärbaren Lahmheiten und Fieber. In der „gesunden“ Gruppe, die 123 Pferde umfasste, wurden 3 – 4 % der Pferde als seropositiv ermittelt, in der „klinisch auffälligen“ Gruppe, bestehend aus 43 Pferden, dagegen 49 % (Browning et al., 1993). Bei einem Pferd mit einem hohen Antikörpertiter im ELISA und nachweislichem Zeckenbefall wurde aufgrund der Historie, der klinischen Anzeichen und des Ansprechens auf eine Antibiotika-Therapie die Verdachtsdiagnose Lyme-Borreliose gestellt. Ein direkter Erregernachweis wurde jedoch nicht erbracht (Browning et al., 1993).

Manion und Mitarbeiter verglichen im Jahr 2001 in einer endemischen Region im US-Bundesstaat Connecticut eine Gruppe von 21 gesunden mit einer Gruppe von 22 klinisch kranken Pferden mit Verdacht auf Lyme-Borreliose. Der Anteil positiver Ergebnisse im Immunblot war bei den klinisch erkrankten Pferden höher als bei den gesunden. Auch die ELISA-Antikörpertiter lagen bei Letzteren tendenziell höher. Darüber hinaus wurde die Wahrscheinlichkeit eines positiven Nachweises von *B. burgdorferi* in Blut bzw. Urin mittels PCR basierend auf den nachstehenden Untersuchungsergebnissen bei den klinisch erkrankten Pferden höher eingestuft als bei den gesunden Pferden. In der Gruppe der Pferde mit klinischen Symptomen wurde bei zehn von 19 Pferden in Blutproben Borrelien-DNA detektiert, in der Gruppe der gesunden Pferde gelang dies nur bei einem Pferd von 20. (Manion et al., 2001).

Im Gegensatz zu den oben genannten ließen die Ergebnisse anderer seroepidemiologischer Studien keinen Zusammenhang zwischen positiven Ergebnissen serologischer Untersuchungen auf Antikörper gegen *B. burgdorferi* und dem Auftreten von vermuteten klinischen Manifestationen equiner Lyme-Borreliose erkennen.

Käsbohrer und Schönberg testeten im Jahr 1988 im Rahmen von serologischen Untersuchungen mittels zweier Testsysteme (IFAT und ELISA) bei Haustieren in Berlin auch 224 Pferdeblutproben. Bei beiden Testsystemen wurde *B. burgdorferi*, das Berliner Zeckenisolat 2/B45 bzw. der amerikanische Stamm B31 (*B. burgdorferi* s.s.), als Antigen eingesetzt. Bei der Untersuchung mittels IFAT erreichte keine Probe den Grenzwert von 1:128. Im ELISA zeigten 16 % der Pferde positive Antikörpertiter mit dem Berliner Isolat, dagegen 5,8 % mit B31. Die positiven Proben erreichten Titer bis 1:256. Über klinisch auffällige Tiere wurde nicht berichtet (Käsbohrer und Schönberg, 1990).

Im Jahr 1992 publizierten Cohen und Mitarbeiter eine Studie aus einer Tierklinik in Texas, in der über den Zeitraum des Jahres 1990 insgesamt 469 Serumproben auf Antikörper gegen *B. burgdorferi* untersucht wurden, wovon elf nicht verwertbar waren. Mittels ELISA waren zunächst neun (1,9 %) Proben positiv, von denen eine bei der Wiederholungsuntersuchung erneut positiv reagierte. Das Untersuchungsergebnis dieser Probe mittels Immunblot war dagegen negativ. Die Seroprävalenz wurde aus diesem Grund mit 0 % angegeben. Die hauptsächlichen Vorstellungsgründe der Pferde, die unterschiedlichen Alters, Geschlechts und Rassen waren, bestanden aus Lahmheiten, Kolik, Traumen und Erkrankungen des Respirationstrakts (Cohen et al., 1992).

Aus Japan stammt eine Studie von Tasai und Mitarbeitern, die mittels IFAT unter Verwendung des amerikanischen *B. burgdorferi* s.s. Stammes B31 als Antigen, 700 Seren vor allem von Zuggpferden aus 14 unterschiedlichen Regionen Hokkaidos im Jahr 1992 untersuchten. Von den untersuchten Pferdeproben wurden 32 (4,6 %) positiv bewertet, als der Grenzwert bei 1:32 festgelegt wurde und 11 (1,6 %) positiv bewertet, als der Grenzwert bei 1:64 festgelegt wurde. Die aus vier Distrikten stammenden Seren mit den höchsten Antikörpertitern wurden zusätzlich im ELISA untersucht. Die Unter-

suchungsergebnisse beider Testsysteme zeigten dabei eine signifikante Übereinstimmung zwischen den positiven und negativen Bewertungen ($p > 0,01$). Genaue Angaben zu den ELISA-Testergebnissen fehlen jedoch. Im Rahmen dieser Studie wurden außerdem im Jahr 1991 Seren von 549 Warmblutpferden aus verschiedenen Gebieten Japans im ELISA untersucht, wovon 14 (2,6 %) positiv reagierten. Alle 1.249 untersuchten Pferde wurden augenscheinlich für gesund befunden (Tasai et al., 1993).

Gemäß einer Studie von Carter und Mitarbeiter aus dem Jahr 1994 kommen Borrelieninfektionen bei Pferden in den meisten Gebieten des Vereinigten Königreichs vor, wobei hinsichtlich der Seroprävalenz regionale Unterschiede festgestellt wurden. Das Vorkommen von Erkrankungen an equiner Lyme-Borreliose wurde als selten eingestuft (Carter et al., 1994).

Eisner und Mitarbeiter (1994) postulierten, dass bei einer möglichen intrauterinen Borrelieninfektion kein erhöhtes Risiko eines frühen embryonalen Todes oder eines Abortes für die Frucht besteht. Im Jahr 1991 untersuchten sie in ihrer Studie tragende Zuchtstuten zweier Gestüte in New Jersey auf Antikörper gegen *B. burgdorferi* mittels ELISA und kontrollierten den Verlauf der Gravidität hinsichtlich eines frühen embryonalen Todes (vor dem 45. Tag der Gravidität) und eines Abortes (nach dem 45. Tag der Gravidität). Um Aufschluss über die Seroprävalenz gegenüber *B. burgdorferi* in beiden Gestüten zu bekommen, waren alle Zuchtstuten der Studie bereits ein Jahr zuvor mittels ELISA untersucht worden. Von 78 Stuten des Gestüts A wurden 66 % positiv untersucht, von 47 Stuten des Gestüts B waren weniger als 3 % positiv. Der zweite Test mittels ELISA erfolgte zwischen dem 34. und dem 45. Tag der Gravidität. Neunzehn Stuten des Gestüts A, die bei dem ersten Test seronegativ waren, wurden positiv oder hochpositiv untersucht, 34 Stuten waren zu beiden Testzeitpunkten seropositiv. Eine dieser Stuten zeigte mögliche Anzeichen einer Borrelieninfektion (Fieber, Gelenkschwellung, Inappetenz) und abortierte fünf Monate nach Verschwinden dieser Symptome. Der Fötus stand jedoch nicht für eine Autopsie zur Verfügung. Im Gestüt B gab es keine Stute, die serokonvertierte. Hinsichtlich der Inzidenz eines frühen embryonalen Todes gab es keine Unterschiede zwischen den beiden Gestüten (Gestüt A: 12,8 %, Gestüt B: 7,3 %), Aborte nach dem 45. Graviditätstag gab es hingegen bei Stuten des Gestüts A häufiger (Gestüt A: 10 %, Gestüt B: 2 %). Es konnte jedoch keine Korrelation zwischen dem Borrelien-Infektionsstatus der betreffenden Stuten und dem frühen embryonalen Tod oder Abort beobachtet werden. (Eisner et al., 1994).

In einer Übersichtsarbeit bestätigten Venner und Deegen (1996) das häufige Vorliegen positiver Antikörpernachweise gegen *B. burgdorferi* beim Pferd ohne jegliches Auftreten klinischer Krankheitssymptome. Sie konnten aus dem vorliegenden Schrifttum keinen Beweis für Erkrankungen potentiell infizierter Pferde an Lyme-Borreliose ableiten. (Venner und Deegen, 1996).

Gerhards und Wollanke (1996) überprüften anhand von 153 augengesunden und 79 an equiner rezidivierender Uveitis (ERU) erkrankten Pferden aus dem Patientengut der Pferdeabteilungen der Chirurgischen und der Medizinischen Tierklinik der LMU München eine mögliche Assoziation zwischen einem serologisch positiven Antikörpernachweis gegen Borrelien mit vergleichsweise hohen Antikörpertitern und dem Vorkommen der ERU. Insgesamt reagierten 112 (48 %) der 232 Probandenserumproben positiv im IFAT. Zweiundzwanzig der Pferdserumproben wurden zusätzlich im Immunblot auf Antikörper gegen Borrelien untersucht. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorkommen der ERU und erhöhten Antikörpertitern gegen Borrelien wurde nicht festgestellt. Auch konnte keine sonstige klinische Symptomatik im Sinne einer Lyme-Borreliose (siehe Kapitel 2.4.3.1) bei Pferden mit hohen Serumantikörpertitern gegen Borrelien festgestellt werden (Gerhards und Wollanke, 1996).

In Mexiko (Monterrey, Nuevo Leon) wurde eine Studie von Salinas-Melendez (2001) und Mitarbeitern durchgeführt. Aus verschiedenen Regionen wurden Proben von 100 Pferden mittels IFAT untersucht. Proben mit positivem Untersuchungsergebnis wurden anschließend zusätzlich im Immunblot untersucht. Insgesamt 34 Seren reagierten bei einer Verdünnungsstufe von 1:64 im IFAT positiv,

sechs davon wiederum bei 1:128, drei bei 1:256 und schließlich eine bei 1:512. Letztere war als einzige Probe auch im Immunblot positiv. Das Pferd, von dem diese Probe stammte, lahmte zu dem Zeitpunkt der Blutentnahme. Allerdings konnte in der Studie keine Assoziation zwischen klinischen Anzeichen und Seropositivität festgestellt werden (Salinas-Melendez et al., 2001).

In einer Studie aus Schweden von Egenvall und Mitarbeitern (2001) wurde basierend auf der Untersuchung von 2.018 Pferdeblutproben aus dem Patientengut von Pferdekliniken unterschiedlicher Regionen mittels IFAT eine Seroprävalenz von 16,8 % für *B. burgdorferi* s.l. (*B. afzelii*) bzw. von 16,7 % für granulozytäre *Ehrlichia* spp. ermittelt. Dabei wurden in der 1.618 Pferde umfassenden Gruppe der „nicht-gesunden Pferde“, die aufgrund von klinischen Problemen vorgestellt wurden, jeweils 16,9 % positiv auf *B. burgdorferi* s.l. und granulozytäre *Ehrlichia* spp. untersucht. In der Gruppe der „gesunden Pferde“, die keine Anzeichen einer durch Zecken übertragbaren Infektion aufwiesen und die aus 400 Pferden bestand, wurden 16,5 % positiv auf *B. burgdorferi* s.l. und 15,5 % positiv auf granulozytäre *Ehrlichia* spp. untersucht. Der Vergleich der Geschlechter ergab bei den Wallachen (n=916) eine Seropositivität von 15,5 % gegenüber *B. burgdorferi* s.l., bei den Stuten (n=808) reagierten 19,6 % positiv und bei den Hengsten (n=294) 13,6 %. Jüngere Pferde im Alter von 0 bis 2 Jahren (n=231) wiesen eine höhere Seroprävalenz von Antikörpern gegenüber *B. burgdorferi* s.l. auf (19,9 %) als Pferde ab einem Alter von über 15 Jahren (n=99) (15,2 %). Der Vergleich der Rassen ergab bei den Warmblutpferden (n=637) eine Seropositivität von 22,5 % gegenüber *B. burgdorferi* s.l., bei den Kaltblutpferden (n=157) eine Seropositivität von 8,3 %. Die höchste Seroprävalenz für *B. burgdorferi* s.l. wurde in den Monaten von Juli bis September ermittelt, in dieser Zeit wurden von 484 Pferden 23,1 % positiv untersucht. Von 598 Pferden ohne Weidegang waren 10,9 %, von 489 Pferden mit jährlichem Weidegang von über drei Monaten waren 22,7 % positiv. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Seropositivität gegenüber *B. burgdorferi* s.l. und dem Alter, der Rasse, der geographischen Region, der Titerhöhe gegenüber *Ehrlichia* spp. sowie dem Auftreten von Hufgelenksarthritiden dargelegt. Aus klinischer Sicht wurde in der Schlussfolgerung eine Assoziation zwischen positiven Antikörpertitern gegenüber *B. burgdorferi* s.l. und dem Auftreten von Lahmheit, Abgeschlagenheit, Arthritis (mit Ausnahme der Hufgelenksarthritiden), mangelhafter Rittigkeit sowie anderen klinischen Symptomen, die mit einer Lyme-Borreliose in Zusammenhang gebracht wurden jedoch ausgeschlossen. (Egenvall et al., 2001).

Mittels dreier verschiedener ELISA-Testsysteme, basierend auf europäischen Isolaten von *B. afzelii* (ELISA A), *B. burgdorferi* s.s. (ELISA B) und *B. garinii* (Stamm 1B29) (ELISA C) sowie einem IFAT basierend auf *B. garinii* (Stamm 1B29) wurden 220 Patienten der Klinik für Pferde des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin unabhängig von der klinischen Symptomatik auf Antikörper (IgG) gegen *B. burgdorferi* s.l. untersucht (Schönert et al., 2002). Ein Teil der Seren wurde ferner mittels Immunblot sowie mittels eines weiteren ELISA untersucht. Gewebeproben (Haut, n=14; Liquor, n=15; Synovia, n=26) von 117 klinisch auffälligen Patienten wurden zusätzlich mit direkten Nachweismethoden (Kultivierung und PCR) untersucht, ferner wurden 19 Vollblutproben mittels PCR untersucht. Die mit den drei ELISA-Testsystemen bzw. mittels IFAT ermittelten Seroprävalenzen der insgesamt 337 untersuchten Pferde betrugen 61,1 %, 9,8 %, 3,3 % bzw. 33,2 %. Die Erregeranzüchtung aus Gewebeproben (n=55) verlief in allen Fällen negativ. Der spezifische Nachweis von Borrelien-DNA gelang in 12 von 74 Proben. Weder bei den seropositiven noch bei den PCR-positiven Pferden war ein Zusammenhang mit der klinischen Symptomatik eindeutig nachweisbar (Schönert et al., 2002).

Aus Österreich stammt eine Arbeit von Müller und Mitarbeitern (2002), die im Jahr 1998 im Frühling sowie neun Monate später Blutproben von 309 Pferden bzw. 186 dieser Pferde aus der spanischen Hofreitschule in Wien und von mehreren Gestüten entnahmen, um Untersuchungen mittels Immunblot durchzuführen. Alle Tiere waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme augenscheinlich gesund.

Als Testantigene wurden *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. lusitaniae* und *B. valaisiana* verwendet, für jede der fünf Genospezies des *B. burgdorferi* s.l.-Komplexes wurden ein separate Teststreifen hergestellt. Dabei wurde *B. afzelii* als dominantes infektiöses Agens ermittelt. Von den 186 Serumpaaren, die jeweils aus den Proben der 1. und 2. Blutentnahme gebildet wurden, reagierten im ersten Durchgang 52 % bis 91 % der Proben auf dieses Antigen positiv, im zweiten Durchgang 53 % bis 93 %. Die Auswertung der Immunblotergebnisse erfolgte nach sechs unterschiedlichen Interpretationskriterien. Die Studienergebnisse zeigten, dass Pferde mit *B. burgdorferi* s.l. (v.a. mit *B. afzelii*) infiziert werden, aber selten, wenn überhaupt, klinische Erkrankungen ausbilden (Müller et al., 2002).

Stefancikova und Mitarbeiter untersuchten in den Jahren 2001 bis 2003 insgesamt 395 Pferdeseren aus zwölf unterschiedlichen geographischen Regionen in Polen auf Antikörper (IgG) gegen *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* und *B. garinii* mittels ELISA. Die mittlere Seroprävalenz lag bei 25,6 %. Von den gesammelten Proben wurden 98 Seren einem differenzierten ELISA-Test unterzogen. In einem Test wurde *B. garinii* als Antigen verwendet, ein Test basierte auf einer Kombination aus *B. burgdorferi* s.s. und *B. afzelii*, ein weiterer Test auf *B. afzelii*. In diesen Tests reagierten 25,5 %, 36,7 % bzw. 42,8 % der Pferde positiv. *B. afzelii* wurde somit als dominante Genospezies ermittelt. Von den ELISA-positiven Proben wurden 25 anschließend mit einem Immunblot basierend auf *B. burgdorferi* s.s. und *B. afzelii* untersucht, wobei 15 (60 %) der positiven Resultate bestätigt wurden. Vorberichtlich lagen keine klinischen Anzeichen einer Infektion bei den Pferden vor (Stefancikova et al., 2008).

In einer Studie von Bhide und Mitarbeitern (2008) wurden Blutproben, die im Zuge eines Routinechecks in einer Pferdeklinik in Izmir bei 300 gesunden Pferden entnommen worden waren, untersucht, um erstmalig Aufschluss über die Seroprävalenz gegenüber *B. burgdorferi* in der Türkei zu bekommen. Untersucht wurden die Proben mit Hilfe des BAT (flow-cytometry-based borreliacidal antibody test), bei dem in einem Durchflusszytometer Zellen mittels eines Lasers typisiert werden und im ELPAGA (enzyme-linked protein A/G assay). Im BAT wurden 6,33 %, im ELPAGA 6 % der Seren positiv beurteilt. Dabei zeigte keines der positiv untersuchten Pferde klinische Anzeichen auf eine Borrelien-Infektion (Bhide et al., 2008).

Durrani und Goyal publizierten im Jahr 2011 Daten zur Seroprävalenz von *B. burgdorferi* bei Pferden in Minnesota. Sie untersuchten 1.260 Pferdeserumproben, die von 112 Veterinärkliniken im Zeitraum von 2001 bis 2010 bereitgestellt wurden mittels IFAT, dessen Grenzwert bei einer Verdünnungsstufe von 1:320 lag. Insgesamt 739 Proben der 1.260 Pferdeseren wurden positiv beurteilt, dies entspricht einer durchschnittlichen Seroprävalenzrate von 58,7 %. Die höchste Prävalenz wurde mit 93,9 % im Jahr 2009, die niedrigste mit 21 % im Jahr 2001 ermittelt. Von Januar bis Mai 2010 wurden 92 % der Proben positiv bewertet. Berichte über klinische Anzeichen einer Lyme-Borreliose (siehe Kapitel 2.4.3.1) der Pferde fehlen, auch werden keine Gründe für ihre Vorstellung in den Pferdekliniken genannt (Durrani und Goyal, 2011).

May untersuchte Blutserum von 415 gesunden Pferden und Blutserum und Kolostrum von 54 Stuten/Fohlenpaaren im ELISA und Westernblot auf Antikörper gegen *B. burgdorferi* (May, 2009). 118 Seren (28,4 %, Profil 1) waren seronegativ. 121 Seren (29,2 %, Profil 2) reagierten im Westernblot nur mit unspezifischen oder kreuzreagierenden *B. burgdorferi* Antigenen. 46 % dieser Seren reagierten im ELISA falsch positiv. Nach Absorption verringerte sich dieser Anteil auf 17,1 %. 94 Seren (22,6 %, Profil 3) wurden aufgrund der Reaktivität mit einem *B. burgdorferi*-spezifischen Antigen als verdächtig eingeordnet. Hier hatte die Absorption keinen Einfluss auf die Rate an ELISA-negativen und -positiven Reagenten. Die 82 Seren mit dem Profil 4 (19,8 %) wurden aufgrund ihrer Reaktionen mit mindestens zwei *B. burgdorferi* spezifischen Partialantigenen als seropositiv eingeordnet, 14 dieser Seren (17,1 %) reagierten im ELISA falsch negativ. In den Analysen an den 54 Stuten-/Fohlenpaaren war ein kolostraler Transfer von *B. burgdorferi* -spezifischen Antikörpern von seropositiven Stuten

auf ihre Fohle nachweisbar. Um Pferde mit einer *B. burgdorferi* -spezifischen Serokonversion sicher zu identifizieren ist laut May eine Zweistufen-Diagnostik (ELISA in Kombination mit Westernblot) unerlässlich (May, 2009).

2.4.3.3 Experimentelle Infektionen und Immunantwort

Bislang wurden nur wenige Infektionsexperimente mit Equiden durchgeführt mit dem Ziel, Erkenntnisse über mögliche klinische Ausprägungen der equinen Lyme-Borreliose und die Immunantwort von Pferden gegenüber Borrelien zu erlangen.

Burgess und Gendron-Fitzpatrick (1990) infizierten vier Ponys intravenös mit *B. burgdorferi* s.s.. Bei der Obduktion der Tiere konnten Läsionen der Synovialis mit unterschiedlich ausgeprägten Proliferationen und perivaskulären Leukozytenansammlungen beobachtet werden. Sie wiesen ferner geringe bis mittelgradige lymphoplasmatische perivaskuläre Infiltrationen in Nieren, Herz, Lunge und Leber auf. Die Erregerisolierung gelang aus Urin, Blut, Gehirn und Lunge. Über klinische Symptome wurden seitens der Autoren keine Aussagen getroffen (Burgess und Gendron-Fitzpatrick, 1990).

Chang und Mitarbeiter (2000) infizierten acht gegen *B. burgdorferi* s.s. geimpfte und vier ungeimpfte einjährige SPF-Ponys (spezifiziert pathogen freie Ponys) durch Ansetzen potenziell infizierter adulter Zecken. Diese wurden mittels Schlepptüchern in einem Waldgebiet in Westchester County im US-Bundesstaat New York gesammelt. Um die Infektionsrate für *B. burgdorferi* in den Zecken bestimmen zu können, wurden 20 der gesammelten Zecken zerkleinert und einzeln in BKS-II-Medium kultiviert. Mittels Dunkelfeldmikroskopie und IFAT wurde eine Infektionsrate von 55 bis 60 % bestimmt. Bei der ungeimpften Kontrollgruppe konnten 2 - 3 Monate nach der Zeckenexposition Antikörper mittels der KELA-Methode (kinetic ELISA) festgestellt werden, die bis zum Versuchsende ca. vier Monate nach der Zeckenexposition persistierten. Mit dem Immunblot waren acht bis zehn Wochen nach dem Kontakt mit den infizierten Zecken multiple Banden nachweisbar. Im Rahmen der Obduktion der Tiere konnte *B. burgdorferi* s.s. aus verschiedenen Geweben (Lymphknoten, Muskeln, Gelenken und Schilddrüse) der ungeimpften Ponys isoliert werden, bei den geimpften Ponys verliefen die Kultivierungsversuche negativ. Klinische Anzeichen einer Lyme-Borreliose konnten weder bei den geimpften Ponys, noch bei der Kontrollgruppe festgestellt werden. (Chang, et al., 2000).

Divers und Mitarbeiter (2003) stellten bei gleichermaßen infizierten SPF-Ponys Antikörper mittels ELISA 5 - 6 Wochen p.i. fest, hohe Titer wurden 3 - 4 Monate p.i. erreicht und blieben bis zur Euthanasie der Tiere neun Monate nach Zeckenexposition bestehen. Im Unterschied zum ELISA war die Untersuchungsergebnisse mittels Immunblot erst 10 - 12 Wochen p.i. positiv (Divers et al., 2003).

Tabelle 6: Übersicht über seroepidemiologische Studien

Studie	Testsystem	Antigen/Genospezies	Anzahl Proben	Prävalenz
Burgess, 1988	IFAT	(<i>B. burgdorferi</i> s.s.) (IgG)	190	62,11%
Magnarelli et al., 1988	IFAT	(<i>B. burgdorferi</i> s.s.) (IgM)	705	5,3%
		(IgM und/oder IgG)		12,8%
Lindenmayer et al., 1989	IFAT	keine Angaben	19	74%
			61	75%
Käsbohrer et al., 1990	IFAT	<i>B. burgdorferi</i> 2/B45 <i>B. burgdorferi</i> s.s.	224	0%
Tasai et al., 1993	IFAT	<i>B. burgdorferi</i> s.s. (IgG)	700	4,6%
Gerhards et al., 1996	IFAT	keine Angaben	232	48%
Salinas- Melendez et al., 2001	IFAT	keine Angaben (IgG)	100	34%
Egenvall et al., 2001	IFAT	<i>B. afzelii</i>	2018	16,8%
Schönert et al., 2002	IFAT	<i>B. garinii</i> (IgG)	337	33,2%
Durrani und Goyal, 2011	IFAT	keine Angaben (IgG)	1260	58,7%
Cohen et al., 1988	ELISA	(<i>B. burgdorferi</i> s.s.) (IgG)	53 (Jährlinge)	März 53,3%
			115 Stuten	Juli 47,8%
			6 Hengste	September 35,9%
				60%
				66,7%
Käsbohrer et al., 1990	ELISA	<i>B. burgdorferi</i> 2/B45 <i>B. burgdorferi</i> s.s.	224	16%
Cohen et al., 1992	ELISA	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	469	0%

Browning et al., 1993	ELISA	<i>B. burgdorferi</i> s.s. (IgG)	123 ("gesunde Gruppe") 43 ("klinisch auffällige Gruppe")	3% - 4% 49%
Tasai et al., 1993	ELISA	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	549	2,6%
Schönert et al., 2002	ELISA A	<i>B. afzelii</i>	337	61,1%
	ELISA B	<i>B. burgdorferi</i> s.s. <i>B. garinii</i>	337	9,8%
	ELISA C	(IgG)	337	3,3%
Stefancikova et al., 2008	ELISA	<i>B. burgdorferi</i> s.s., <i>B. garinii</i> , <i>B. afzelii</i> (IgG)	395	25,6%
Müller et al., 2002	Immunblot		311	Kriterien
		<i>B. afzelii</i>		USA 66,6% Europa 83,6%
		<i>B. burgdorferi</i> s.s.		25,1% 93,3%
		<i>B. garinii</i>		15,8% 88,4%
		<i>B. lusitaniae</i>		0%
		<i>B. valaisiana</i>		12,4%

2.5 Diagnostik

Aufgrund der unterschiedlichen klinischen Erscheinungsbilder ist die Bestätigung der klinischen Diagnose der Lyme-Borreliose durch Laboruntersuchungen unerlässlich. Die Durchführung des direkten Erregernachweises mittels PCR wird insbesondere bei Fällen, wie z.B. bei Hautmanifestationen mit atypischer Symptomatik, akuter Neuroborreliose bei negativer Serologie und Lyme-Arthritis befürwortet

(Quelle: Fingerle, Nationales Referenzzentrum Borrelien,

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (2008), URL:

http://www.lgl.bayern.de/gesundheits/infektionsschutz/infektionskrankheiten_a_z/borreliose/lyme_diagnostik.htm (Stand 22.07.2013)).

Für die Diagnostik der Lyme-Borreliose beim Pferd wurden bislang keine Empfehlungen formuliert, laut den Erkenntnissen von May ist eine Zweistufendiagnostik (ELISA in Kombination mit Westernblot), wie sie in der Humanmedizin empfohlen wird, unerlässlich (May, 2009).

Tabelle 7: Untersuchungsmaterial für die Diagnostik der Lyme-Borreliose des Menschen

Klinische Manifestation	Untersuchungsmaterial	
	Erregernachweis	Antikörpernachweis
Stadium I (früh / lokalisiert) Tage bis Wochen nach Zeckenstich		
<i>Erythema migrans</i>	Hautbiopsie	Serum
Stadium II (früh / disseminiert) Wochen bis Monate nach Zeckenstich		
Multiple Erytheme	Hautbiopsie	Serum
Borrelien Lymphozytom	Hautbiopsie	Serum
Karditits	Myocardiopsie	Serum
Neuroborreliose	Liquor	Liquor/Serumpaar
Ophthalmoborreliose		Serum
Stadium III (spät / persisten)		
Arthritis	Gelenk Punktat	Serum
	Synovia Biopsie	
Acrodermatitis chronica atrophicans	Hautbiopsie	Serum
Chronisch progrediente Enzephalomyelitis	Liquor	Liquor/Serumpaar

(Quelle: Fingerle, Nationales Referenzzentrum Borrelien, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (2008), URL: http://www.lgl.bayern.de/gesundheits/infektionsschutz/infektionskrankheiten_a_z/borreliose/lyme_diagnostik.htm (Stand 22.07.2013)).

2.5.1 Direkter Erregernachweis

2.5.1.1 Mikroskopie

Die lichtmikroskopische Identifizierung von *B. burgdorferi* kann im Dunkelfeld oder nach Anfärbung z.B. mittels Giemsa-Lösung erfolgen. Die heutige Standardmethode für den Direktnachweis ist die Dunkelfeldmikroskopie (Burgdorfer, 1984).

Allerdings ist die Anzahl der Borrelien im infizierten Gewebe normalerweise unterhalb der mikroskopischen Nachweisgrenze von ca. 10^3 - 10^4 /ml. Der Vorteil gegenüber der Auflichtmikroskopie liegt darin, dass keine Fixierung oder Färbung des zu untersuchenden Materials notwendig ist. Da Borrelien sehr empfindlich auf physikalische und chemische Einflüsse reagieren, kann das zu numerischen oder morphologischen Veränderungen führen (Wilske and Preac-Mursic, 1993). Der direkte mikroskopische Nachweis ist jedoch für Patientenproben ungeeignet. Für Patientenproben müssen empfindlichere Verfahren, wie die Anzucht vermehrungsfähiger Erreger (siehe Kapitel 2.5.1.2) und der anschließende Nachweis im Dunkelfeldmikroskop durchgeführt werden.

2.5.1.2 Kultivierung

B. burgdorferi vermehrt sich in mikroaerophilem Milieu durch Querteilung. Die Verdopplungszeit kann 8 bis 20 Stunden betragen und dauert somit im Vergleich zu vielen anderen Bakterien sehr lange. Häufig sind Borrelien erst nach wochenlanger Inkubation nachweisbar (Burgdorfer, 1984).

Die kulturelle Anzucht von Borrelien gestaltet sich deshalb schwierig, weil der langsame Teilungsvorgang die Überwucherung durch Begleitkeime begünstigt und somit zum Absterben der Borrelien führen kann (Schönberg et al., 1989). Außerdem werden vergleichsweise aufwändige Nährmedien benötigt, da *B. burgdorferi* keine Aminosäuren, Fettsäuren, Cofaktoren und Nukleotide synthetisieren kann. Zur Kultivierung wird ein entsprechend komplexes serumsupplementiertes Zellkulturmedium verwendet (Fraser et al., 1997), das unter anderem Aminosäuren, Vitamine, anorganische Salze, N-Acetyl-Glucosamin (Einbau in die Zellwand), Serumalbumin und Kaninchenserum enthält und nach seinen Entwicklern Barbour, Stoenner und Kelly benannt wurde (Barbour-Stoenner-Kelly-Medium, BSK-Medium)(Barbour, 1984).

Spätere Modifizierungen des Mediums zur Verbesserung des Borrelienwachstums führten unter anderem zum Modified-Kelly-Medium (MKP) (Preac-Mursic et al., 1986) und zum BSK-H mit 6 % Kaninchenserum.

Zur Isolierung des Erregers werden in Abhängigkeit von der Symptomatik verschiedene Gewebe (z.B. Blut, Synovia, Liquor, Hautbiopsate) (siehe Tabelle 7) verwendet. Sie kann auch aus Material des Zerkendarmes erfolgen. Aufgrund der oft nur sehr geringen Erregerdichte in den infizierten Geweben wird die Anzucht weiter erschwert (Preac-Mursic et al., 1984; Steere 1989). Die größte Wahrscheinlichkeit einer positiven Kultivierung aus Untersuchungsmaterial von einem Lyme-Borreliose-Patienten bietet die Hautbiopsie aus der Umgebung eines *Erythema migrans* (Berger et al., 1992). Das nationale Referenzzentrum (2008) gibt die Erfolgsrate einer Kultivierung von Borrelien aus Hautproben (*Erythema migrans*, ACA) mit 50 % bis 70 % an, bei Liquorproben (Neuroborreliose II) liegt die Erfolgsrate bei 10 % bis 20 %. Die Kultivierung von Gelenkpunktaten ergibt extrem selten positive Resultate, deshalb wird in diesem Falle die Durchführung einer PCR empfohlen.

(Quelle: Fingerle, Nationales Referenzzentrum Borrelien, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (2008), URL: http://www.lgl.bayern.de/gesundheitschutz/infektionskrankheiten_a_z/borreliose/lyme_diagnostik.htm (Stand 22.07.2013)).

Beim Pferd wurden bislang in Abhängigkeit vom Krankheitsbild insbesondere Liquor, Synovia, Blut und Haut aber auch andere Gewebe wie Gehirn (Burgess and Mattison, 1987), Sklera, Retina, Lymphknoten, Lunge, Leber und Milz (Liebisch et al., 1999; Liebisch et al., 2002) sowie Urin (Manion et al., 1998) als Untersuchungsmaterialien verwendet.

Die Entnahme von Hautbiopsien ist beim Pferd kaum möglich, da Zeckenstiche durch den Fellbesatz meist nicht erkannt werden.

Wegen der langen Untersuchungsdauer und des oben genannten hohen methodischen Aufwandes ist der Nachweis von Borrelien mittels Kultivierung keine geeignete Methode für die Routinediagnostik.

2.5.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode zur exponentiellen Vervielfältigung definierter DNA-Abschnitte in-vitro. Diese Eigenschaften machen sie zu einer hochspezifischen und sensitiven Diagnostikmethode, die sich zum Nachweis sehr geringer Erregermengen aus unterschiedlichem Probenmaterial eignet.

Eine entscheidende Voraussetzung ist die Identifizierung entsprechender (geno-speziespezifischer) Zielsequenzen auf dem Borreliengenom sowie geeigneter Oligonukleotide (Primer) als Ausgangspunkte für die Amplifikation.

Beim Amplifikationsvorgang der PCR wiederholen sich Reaktionszyklen, die in drei Phasen bei jeweils unterschiedlichen Temperaturen ablaufen.

Die vielfache Wiederholung dieser drei Phasen, in der Regel werden 30 bis 35 Reaktionszyklen durchlaufen, führt theoretisch zur Verdoppelung der Anzahl der Zielsequenzen bei jedem Reaktionszyklus und damit zur exponentiellen Vermehrung der Zielsequenz im Verlauf einer PCR.

Während bei der konventionellen PCR die Amplifikate mit Hilfe der Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden müssen und zur Verifizierung der Amplifikate eine Sequenzierung erfolgen muss, welcher die Gewinnung und Aufreinigung der DNA vorausgehen muss, erfolgen diese Schritte bei der Real-Time PCR durch den Einsatz spezifischer fluoreszenzmarkierter Sonden bereits im Verlauf der PCR. Die Fluoreszenzmessung bei jedem Reaktionszyklus ermöglicht ferner eine Quantifizierung der Zielsequenz im Probenmaterial. Die Kontaminationsgefahr ist durch die Nutzung eines geschlossenen Systems bei der Real-Time PCR im Gegensatz zur konventionellen PCR deutlich reduziert.

Die Polymerase-Kettenreaktion bietet im Gegensatz zur kulturellen Anzucht den Vorteil der schnellen Durchführbarkeit. Außerdem lässt sich auch dann ein Erregernachweis erbringen, wenn die Borrelien bereits abgestorben sind (Malloy et al., 1990). Die PCR aus Urin und Blut kann nach derzeitigem Wissensstand nicht für die Diagnostik empfohlen werden. Der Erregernachweis mittels PCR sollte nur in spezialisierten Laboratorien durchgeführt werden (z.B. im Nationalen Referenzzentrum für Borrelien). (Fingerle, 2015).

2.5.2 Indirekter Erregernachweis

Zu den indirekten Nachweisverfahren gehören der Immunfluoreszenztest (IFAT/IFT), der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) und der Immunblot. In der Routinediagnostik werden beim Pferd in der Regel die beiden ersteren Untersuchungsverfahren eingesetzt.

B. burgdorferi-Antikörper können mit den Oberflächenantigenen verschiedener Bakterien kreuzreagieren. Deshalb können falsch positive Untersuchungsergebnisse unter anderem auf Kreuzreaktionen zurückgeführt werden (Lindenmayer et al., 1990). In der Humanmedizin treten Kreuzreaktionen vor allem in Anwesenheit von *Treponema pallidum*, dem Erreger der Syphilis, und bei Leptospirenbefall in Erscheinung; bei beiden Bakterien handelt es sich wie bei *B. burgdorferi* um eine Spirochäte. Auch andere Borrelien, die taxonomisch nicht zum *B. burgdorferi* s.l.-Komplexes gehören, wie die sogenannten Rückfallfieber-Borrelien, *B. recurrentis* (Erreger des Läuserückfallfiebers) und *B. duttoni* (Erreger des Zeckenrückfallfiebers) können mit *B. burgdorferi* kreuzreagieren. Sogar Virusinfektionen, z.B. durch das Humane-Herpes-Virus 4 (auch Epstein-Barr-Virus genannt) verursacht, können falsch positive Ergebnisse hervorrufen, ebenso wie bei Patienten, die auf Rheuma-Faktor positiv untersucht wurden (Magnarelli et al., 1987; Panelius et al., 2002).

Beim Pferd muss mit Kreuzreaktionen durch Leptospiren gerechnet werden (Magnarelli et al., 1988). Dies kann insbesondere bei der Interpretation von Testergebnissen des IFAT und des ELISA zu Problemen führen.

Die Ergebnisse der indirekten Nachweisverfahren lassen ferner keine Rückschlüsse auf den Infektionsstatus zu (siehe Kapitel 2.4.2.2).

2.5.2.1 Immunfluoreszenztest

Das Prinzip dieser Technik beruht auf einer Antigen-Antikörperreaktion, die mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops dargestellt werden kann (Coons et al., 1941). Als Antigene dienen inaktivierte Borrelien, die auf Objektträgern mit definierten Feldern fixiert werden. Die für die Testherstellung verwendeten Borrelienisolate, hauptsächlich die dabei verwendete(n) Genospezies, beeinflussen dabei die Testqualität. Die fraglichen Serumproben werden in einer Verdünnungsserie auf die Felder aufgetragen, wodurch gegebenenfalls eine Bestimmung der Antikörperkonzentration in sogenannten Titerstufen möglich ist. Sind Antikörper gegen Borrelien vorhanden, binden diese an die Oberflächenantigene der auf die Objektträger fixierten Borrelien. Die so entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe werden durch die Zugabe eines Anti-Pferd-IgG-Immunglobulins, das mit einem fluoreszierenden Farbstoff (z.B. Fluorescein-Isothiocyanat) markiert wurde, im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht.

Durch unspezifische Fluoreszenzen und das subjektive Auslesen können Schwierigkeiten bei der Borrelien-Diagnostik auftreten. Als Grenztiter für die Borrelien-Diagnostik mittels IFAT beim Pferd wurde in der Vergangenheit mehrheitlich die Verdünnungsstufe von 1:64 eingesetzt (siehe Kapitel 2.4.3) (Magnarelli et al., 1988; Gerhards und Wollanke, 1996; Liebisch et al., 1999; Salinas-Meléndez et al., 2001).

2.5.2.2 ELISA

Die gegenwärtige Empfehlung des Zweistufentests sieht den ELISA im ersten Diagnostikschritt zur Detektion negativer Seren vor. Das Prinzip des ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) basiert auf dem Nachweis einer Antigen-Antikörperreaktion mittels einer gekoppelten enzymatischen Farbreaktion. Das auf einer Mikrotiterplatte fixierte Antigen (Borrelienlysat oder rekombinante Proteine) bildet mit den Antikörpern aus positiven Pferdeseren einen Immunkomplex. Mit diesem Komplex verbinden sich enzymmarkierte anti-Pferd-IgG-Antikörper. Durch Zugabe einer Substratlösung erfolgt durch die Enzymaktivität der gebundenen Antikörper eine Farbreaktion. Die Extinktion dieses bei dieser Reaktion gebildeten Farbstoffes ist nun in einem Mikrotiterplatten-Photometer messbar (Kramer et al., 1992). Bis heute gibt es kein standardisiertes Bewertungssystem, so dass die Herstellerfirmen für ihre ELISA-Testsysteme eigene Einheiten verwenden und der Grenztiter unterschiedlich eingesetzt wird.

Eine Modifikation des klassischen ELISA findet sich im C₆-ELISA. Dieser Test nutzt ein spezifisches synthetisches Peptid, das 25-mer C₆-Peptid. Es ist Teil der nicht variablen Dömanen (IR₁₋₆) innerhalb des variablen Oberflächenproteins VlsE. Der Test ist in der Veterinärmedizin als kommerzieller Schnelltest erhältlich (SNAP® 4Dx Plus Borreliose; IDEXX Laboratories, Inc.), allerdings nur für den Hund und nicht für das Pferd validiert. Aufgrund des Tiergesundheitsgesetzes vom 22.05.2013 kann dieser Test auch beim Pferd eingesetzt werden.

2.5.2.3 Immunblot

Der Immunblot lässt eine differenzierte Analyse der Immunantwort gegenüber bestimmten Antigenen von Erregern zu. Diese Eigenschaft zeichnet die Methode in erster Linie als qualitatives Nachweisverfahren aus. Die gegenwärtige Empfehlung zur serologischen Diagnostik der Lyme-Borreliose sieht sowohl in der Human- als auch der Tiermedizin das Prinzip des Zweistufentests vor (Wilske et al., 2007; Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, 2008; May, 2009; Robert-Koch-Institut, 2013). Der Immunblot wird in diesem Prinzip als zweiter Test zur Charakterisierung reaktiver Seren eingesetzt.

- **Western-Blot**

Das klassische Immunoblotverfahren ist der Western-Blot. Zur Herstellung des Tests werden gereinigte Antigene nach ihrer elektrophoretischen Auftrennung gemäß ihrem Molekulargewicht auf einen festen Trägerstoff übertragen und gebunden (z.B. Nitrozellulose-Papier). Während der anschließenden Inkubation mit zu untersuchenden Seren kommt es, sofern diese entsprechende Antikörper enthalten, zur Bildung von Immunkomplexen mit den passenden Antigenen, die analog zur Vorgehensweise beim ELISA (siehe Kapitel 2.5.2.2) über eine Farbreaktion mittels enzymmarkierter speziesspezifischer anti-Antikörper als gefärbte Banden sichtbar gemacht werden. Mithilfe eines Größenmarkers ist anhand des entstandenen Bandenmusters ersichtlich, gegen welche Proteine des Erregers Antikörper gebildet wurden.

- **Line-Immuno-Assay (LIA)**

Der Line-Immuno-Assay ist eine Weiterentwicklung des Western-Blots, bei der die Herstellung der Teststreifen auf eine andere Weise erfolgt. Die Proteine des Erreger-Antigens werden durch ein spezielles Sprühverfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Nitrozellulosemembran wird dann in Einzelstreifen geschnitten. Der eigentliche Testablauf erfolgt wie für den Western-Blot beschrieben.

Beim Menschen werden etwa zwei bis vier Wochen nach stattgefundener Infektion erste Antikörper im Immunblot sichtbar (siehe Kapitel 2.4.2.2). Anfänglich sind sie vorrangig gegen das Flagellin-Protein (41 kD), das sog. „common Antigen“ (60 kD) und Proteine mit niedrigem Molekulargewicht gerichtet, darunter auch das OspC (22-24 kD) (Simpson et al., 1991). Im weiteren Krankheitsverlauf lassen sich Immunglobuline gegen eine Vielzahl verschiedener Antigene nachweisen.

Als spezifische Immunreaktion, die im Hinblick auf die Diagnose der Lyme-Borreliose aussagekräftig ist, wird die Präsenz von Antikörpern gegen Proteine von 17-18 kD Molekulargewicht, das p39, ein Antigen aus dem hochmolekularen Bereich mit einer Masse von 83 bis 100 kD (p83/p100) und insbesondere das VlsE gewertet. Dieses in vivo-exprimierte Lipoprotein weist konservierte – Genpspezies-übergreifende – hoch immunogene Epitope auf (Liang et al., 1999; Philipp et al., 2001). Das p18 wird überwiegend erst zu einem späten Zeitpunkt bei chronischem Infektionsverlauf identifiziert (Jauris-Heipke et al., 1999). Die intensivste Immunantwort wird von dem 41 (Flagellin-) und 60 kD-Protein induziert, ihr diagnostischer Wert ist jedoch von geringerer Bedeutung, da diese Proteine ausgedehnte Kreuzreaktionen (siehe Kapitel 2.2.3) aufweisen. Als spezifisch und somit diagnostisch aussagekräftig gelten laut Zöller und Mitarbeiter die Proteine OspC, OspA, p39 und p83/p100 (Zöller et al., 1993), Bruckbauer und Mitarbeiter befanden die Proteine p100, p41, OspA und OspC am besten geeignet für die Diagnostik, da sie das geringste Potential zu Kreuzreaktivitäten innerhalb des Genus *Borrelia* aufweisen (Bruckbauer et al., 1992).

Beim Pferd existieren bislang nur unzureichende Kenntnisse hinsichtlich der Ausbildung spezifischer Antikörper gegen bestimmte Borrelienantigene; was die Festlegung von Auswertungskriterien für den Immunblot erschwert. Im Rahmen einer Untersuchung von Dzierzecka und Mitarbeitern (2002) wurden 87 Serumproben von Pferden, die zuvor mittels ELISA auf Borrelien untersucht wurden, mit dem Immunblot analysiert. Die ELISA-positiven Proben reagierten vornehmlich mit Antigenen von 41 kDa, 62/60 kDa, 93 kDa, 72 kDa, 34 kDa (OspB) und 66 kDa Molekulargewicht. Ein großer Anteil (55,5 %) der ELISA-negativen Proben reagierte mit p41, woraus geschlossen wurde, dass Immunreaktionen gegen das Flagellinprotein auch beim Pferd als eher unspezifische Reaktionen in der Borrelien-Diagnostik anzusehen sind (Dzierzecka und Kita, 2002). Laut Müller und Mitarbeitern scheinen die Proteine p41 und p83/p100 zu starken Kreuzreaktionen beim Pferd zu neigen (Müller et al., 2002).

Krupka und Mitarbeiter postulieren, dass sich das DbpA (p17) als geeignetes Protein für die Detektion von equinen Antikörpern gegen *B. burgdorferi* s.l. erweist. Sie fanden zudem heraus, dass bei Proben, die als positiv eingestuft wurden, oftmals die Bandenkombination VlsE-Mix + DbpA-Mix + p83 auftritt. Antikörper gegen OspC und OspA sind bei equinen Serumreaktionen ihren Erfahrungen nach nicht als spezifisch zu interpretieren, vor allem weil OspA-Antikörper sich insbesondere nach Impfungen finden (Krupka et al., 2012).

Auch in der Humanmedizin wurden trotz der Bemühungen verschiedener Arbeitsgruppen in der Vergangenheit, ein einheitliches Schema zu erstellen, Standardisierte Bewertungskriterien der Immunblotbanden bis heute nicht eingeführt (Hauser et al., 1997; Hauser et al., 1999; Robertson et al., 2000).

3 Material und Methoden

3.1. Untersuchungsort

Das Bayerische Haupt- und Landgestüt Schwaiganger liegt in der Region Werdenfels am Fuß der Alpen auf einer Höhe von 665 m über dem Meeresspiegel und gehört zur Gemeinde Ohlstadt im Landkreis Garmisch-Partenkirchen. Im Jahr 2004 erfolgte die Ernennung zum Lehr-, Versuchs- und Fachzentrum für Pferdehaltung der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), dessen Schwerpunkt u. a. in der Förderung der bayerischen Pferdezucht insbesondere durch Bereitstellung züchterisch hochwertiger Vätertiere der Rassen Warmblut und Kaltblut besteht (Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, 2011).

3.2 Vorausgegangene Studie aus dem Jahr 2007

Das ursprüngliche Ziel meiner Arbeit war damals die Bestimmung von Serumantikörpern von Pferden des Bayerischen Haupt- und Landgestüts Schwaiganger gegen *Borrelia burgdorferi* s.l., um Aufschluss über die Immunantwort gegen *B. burgdorferi* s.l. klinisch gesunder Pferde unterschiedlichen Alters und Geschlechts sowie unterschiedlicher Rassezugehörigkeit und Exposition im jahreszeitlichen Verlauf zu erlangen. Zu diesem Zweck wurden die Blutproben des Pferdebestands mittels eines IFAT, eines Immunblot und zweier ELISA untersucht. Ferner wurde die Prävalenz von *B. burgdorferi* s.l. in Zecken des Gestütsgeländes mittels PCR bestimmt.

3.2.1 Untersuchungsmaterial

3.2.1.1 Auswahl der Pferde

Während des einjährigen Probennahmezeitraums von Juli 2005 bis Juni 2006 wurden im Abstand von vier bis sechs Wochen an insgesamt neun Zeitpunkten Blutprobenentnahmen bei Pferden des Landgestüts Schwaiganger durchgeführt (siehe Tabellen 8 und 9). Die Auswahl der Pferde erfolgte unter Berücksichtigung des Alters, des Geschlechts und der Rassezugehörigkeit.

Im Sinne der Vergleichbarkeit der Ergebnisse und einer möglichst vollständigen Abbildung des jahreszeitlichen Verlaufs der Immunantwort gegen Borrelieninfektionen wurden - mit Ausnahme der Fohlen des Geburtsjahrgangs 2005 - nur die Pferde in die Auswertung einbezogen, von denen insgesamt wenigstens fünf untersuchungsfähige Blutproben gewonnen werden konnten. Die Fohlen des Geburtsjahrgangs 2005 wurden aufgrund ihrer geringen Anzahl unabhängig von der Häufigkeit einer erfolgreichen Blutprobenentnahme allesamt in die Studie aufgenommen.

Die Anzahl der untersuchten Pferde belief sich unter Berücksichtigung der oben angegebenen Kriterien auf 153 von insgesamt 330, darunter 103 Warmblut- und 50 Kaltblutpferde (siehe auch Anhang B).

Tabelle 8: Untersuchte Pferde nach Rasse, Geschlecht und Geburtsjahr

Geburtsjahr	Rasse			
	Warmblut		Kaltblut	
	männlich	weiblich	männlich	weiblich
vor 2002	2	12	9	7
2002	5	6	0	2
2003	12	13	6	3
2004	11	12	7	8
2005	10	20	4	4
Anzahl	40	63	26	24
	103		50	

Die Haltungsbedingungen waren abhängig vom Alter und von der Nutzung der Pferde unterschiedlich. Die Deckhengste (bis einschließlich Geburtsjahrgang 2002) waren grundsätzlich in Einzelboxen ohne Weidegang aufgestellt. Der Aufenthalt im Freien beschränkte sich bei diesen Pferden auf gelegentliche Ausritte bzw. Aufenthalte in Paddocks in unmittelbarer Stallnähe.

Die Fohlen wurden bis ca. vier Wochen nach der Geburt gemeinsam mit den Mutterstuten in Einzelboxen gehalten. Die anschließende Laufstallhaltung beinhaltete täglichen Auslauf in stallnahen Paddocks, dessen Zeitdauer in Abhängigkeit von den Witterungsbedingungen variierte. Die ersten Weidegänge fanden im Juli 2005 statt (ungefähr zeitgleich mit der ersten Blutentnahme, siehe Tabelle 9), ebenfalls unter Berücksichtigung der Wetterlage für ca. 6 bis 8 Stunden täglich, an heißen Sommertagen auch über Nacht (ca. 15 Stunden). Bei Dauerregen wurde der Weidegang reduziert oder ausgesetzt. Nach dem Absetzen im Alter von ca. 6 Monaten erfolgte die Aufteilung in Junghengst- bzw. Jungstutengruppen mit Weidehaltung und permanentem Zugang zu Laufställen. Die ein- bis dreijährigen Pferde waren ebenfalls nach Geschlecht und Geburtsjahrgängen in Gruppen aufgeteilt, wobei zum Teil innerhalb der verschiedenen Jahrgänge immer wieder Neugruppierungen vorgenommen wurden. Die Haltung erfolgte wie bei den Absetzern auf großflächigen Weiden mit Zugang zu Laufställen in der weiteren Umgebung des Gestüts.

3.2.1.2 Blutproben

Die Blutentnahme wurde am fixierten Pferd durch Punktion der *Vena jugularis* mittels 0,90 x 40 mm-Kanüle (Firma Braun) und EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)-Röhrchen (Monovette® Firma Sarstedt) durchgeführt.

Zum Zeitpunkt der Blutentnahme waren jeweils alle Pferde augenscheinlich gesund und in einem guten Ernährungs- und Pflegezustand. Darüber hinaus befand sich keines der Pferde in tierärztlicher Behandlung. Die Blutentnahme erfolgte vereinbarungsgemäß nur bei Pferden, die sich ohne die Anwendung besonderer Zwangsmaßnahmen einfangen und fixieren ließen. Aufgrund von Turnierbesuchen, saisonaler Abgabe an Deckstationen oder Verkauf waren zudem nicht alle Pferde bei jedem Blutentnahme-Termin verfügbar. Aus diesen Gründen war es nicht möglich, von allen Pferden einen kompletten Probensatz mit jeweils neun Blutproben zu gewinnen.

Nach der Entnahme wurden die Blutproben unverzüglich bis zur Aufbereitung im Labor in Kühlboxen verbracht. Dort wurden nach Zentrifugation in einer Hettich Universal 30 F Zentrifuge bei 10.000 g und 2000 Umdrehungen pro Minute je zwei Aliquots des Plasmas abpipettiert und in Safe-Lock-Tubes (Firma Eppendorf) verbracht.

Bis zur Untersuchung wurden die Proben bei -20 °C gelagert. Um optimale Untersuchungsbedingungen zu erreichen, wurden trübe oder verunreinigte Proben verworfen.

3.2.1.3 Zecken

Vom Weidegelände der untersuchten Pferde wurden 100 adulte Zecken mittels Schlepptüchern gesammelt, die an den Weiderändern am Übergang zum Buschwerk über die Pflanzen gezogen wurden. Die anhaftenden Zecken wurden mit Pinzetten aufgenommen und in Schraubgefäße verbracht. Nach der Art- und Geschlechtsdifferenzierung unter der Stereolupe wurden die Zecken jeweils in ein Eppendorf-Röhrchen verbracht und bei -80 °C für die Untersuchung mittels PCR gelagert.

3.2.2 Labordiagnostische Untersuchungen aus dem Jahr 2007

3.2.2.1 Indirekter Erregernachweis - Untersuchung der Blutproben

Die Pferdeblutproben wurden im Jahr 2007 mit drei unterschiedlichen immunologischen Methoden bzw. mit vier verschiedenen Testsystemen untersucht:

1. Indirekter Immunfluoreszenztest (IFAT)
2. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)
 - a. ELISA V
 - b. ELISA M
3. Rekombinanter Immunblot (RecomBlot)

Die Untersuchungen mittels IFAT der Herstellerfirma Fa. R-biopharm AG und mittels ELISA V der Fa. Virotech wurden am Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der LMU durchgeführt. Die Untersuchungen mittels RecomBlot und ELISA M der Fa. Mikrogen fanden im firmeneigenen Labor in München-Neuried statt.

Die meisten Blutproben (1.139) wurden mittels Virotech-ELISA untersucht, da entsprechend viele Testkits zur Verfügung standen. Im IFAT wurden 977 Proben untersucht. Beide Untersuchungen wurden zwischen März und Oktober 2007 parallel durchgeführt, so dass für beide Tests ein Aliquot Verwendung fand und somit nur einmal aufgetaut wurde. Die Untersuchungen mit dem Immunblot (816 Proben) und dem ELISA (689 Proben) der Firma Mikrogen fanden vier Monate später statt. Um optimale Untersuchungsbedingungen zu erreichen, wurden zuvor bereits aufgetaute Proben verworfen. Die Anzahl der untersuchten Blutproben wurde nach Verfügbarkeit der jeweiligen Testkits festgelegt. Außerdem reduzierte sich die Menge der Blutproben, da einige Teströhrchen aufgrund von mehrmaligen Auftauvorgängen verworfen werden mussten. Die Probandenzahl wurde der Anzahl der zur Verfügung stehenden Testkits angepasst. Innerhalb der Testgruppen wurde die Auswahl der Pferde derart vorgenommen, dass eine gleichmäßige Verteilung nach Alter, Rasse und Geschlecht gewährleistet blieb. Insbesondere wurde darauf geachtet, dass jeweils die Pferde ausgewählt wurden, von denen die meisten Blutproben gewonnen werden konnten.

Tabelle 9: Zeitpunkte der Blutentnahmen und Anzahl der untersuchten Blutproben

Blutprobenentnahme			Anzahl untersuchter Blutproben		
Datum	Nr.	IFAT	ELISA V	ELISA M	RecomBlot
14.07.2005	1	125	142	23	95
16.08.2005	2	123	143	72	92
22.09.2005	3	122	139	90	100
26.10.2005	4	121	142	94	101
22.11.2005	5	122	141	97	102
04.01.2006	6	116	137	96	102
22.02.2006	7	111	132	97	97
20.04.2006	8	63	76	46	51
08.06.2006	9	74	87	74	76
gesamt		977	1.139	689	816

3.2.2.1.1 ELISA

3.2.2.1.1.1 *Borrelia burgdorferi* Veterinär ELISA (ELISA V)

Der „Veterinär ELISA“ der Firma Genzyme Virotech GmbH wird seit dem Ende der neunziger Jahre kommerziell für den Nachweis von Antikörpern der Klasse IgG gegen *B. burgdorferi* s.s. angeboten. Zur Herstellung des Tests findet *B. burgdorferi* s.s. (Lysat) als Antigen Verwendung. Als Positivkontrolle werden laut Hersteller Pferdeseren eingesetzt, die von Tierärzten zur Verfügung gestellt werden und im Genzyme Virotech „Veterinär ELISA“ positiv reagieren.

Im Test-Kit sind alle benötigten Reagenzien enthalten (siehe Kapitel 12.1.1). Entsprechend den Herstellerangaben wurde der Test wie folgt durchgeführt:

Zu Beginn wurden alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht, die Flüssigkomponenten gut geschüttelt und das Waschlösungskonzentrat auf einen Liter mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Je 10 µl der Plasmaproben wurden mit je 90 µl Puffer vermischt. Von diesen Ansätzen wurden je 10 µl zu je 390 µl Pufferlösung pipettiert, wodurch eine Verdünnung der Plasmaproben von 1:400 hergestellt wurde.

Pro Test wurden jeweils 100 µl des gebrauchsfertigen Verdünnungspuffers (Leerwert), der Negativkontrolle, der Cut-off-Kontrolle, der Positivkontrolle und der verdünnten Plasmaproben in Kavitäten einer Mikrotiterplatte pipettiert, wie in der Anleitung beschrieben. Nach der ersten Inkubation unter Abdeckung für 30 Minuten bei 37 °C erfolgte ein Waschvorgang mit je 350 µl Waschlösung pro Kavität, der viermal wiederholt wurde. Die verbliebenen Flüssigkeitsreste wurden jeweils durch Ausklopfen auf einer Zellstoffunterlage entfernt. Im Anschluss wurden pro Kavität 100 µl des gebrauchsfertigen Konjugats zugefügt. Die nächste Inkubation und die folgenden Waschvorgänge wurden auf die vorstehende Weise wiederholt. Danach wurden 100 µl der gebrauchsfertigen Substratlösung in jede Kavität pipettiert. Die anschließende Inkubation (unter Abdeckung für 30 Minuten bei 37 °C) fand zusätzlich unter Abdunkelung statt. Die Substratreaktion wurde durch Zugabe von je 50 µl Citrat-Lösung pro Kavität gestoppt. Bis zur vollständigen Durchmischung, d. h. bis eine homogene Färbung ersichtlich war, wurden die Platten geschwenkt. Die Messung der Extinktionswerte erfolgte innerhalb einer Stunde nach Zugabe der Stopplösung mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 450/620 nm. Die gemessene Extinktion des Leerwertes wurde dabei automatisch von den Extinktionswerten der übrigen Proben abgezogen.

Die Konzentration der IgG-Antikörper wurde in Virotech Einheiten (VE) angegeben, die nach folgender Formel berechnet wurden:

$$VE \text{ (positive Kontrolle)} = \frac{OD(\text{positive Kontrolle})}{OD(\text{cut-off Kontrolle})} \times 10$$

$$VE \text{ (Tierserum)} = \frac{OD(\text{Tierserum})}{OD(\text{cut-off Kontrolle})} \times 10$$

Nach dem Auswertungsschema wurden die Proben wie folgt beurteilt:

- VE < 8,0 = negativ
- VE 8,0 - 12,0 = grenzwertig
- VE > 12,0 = positiv.

3.2.2.1.1.2 RecomWell Borrelia (ELISA M)

Der ELISA „recomWell Borrelia IgG“ der Firma Mikrogen wurde für den Nachweis von IgG-Antikörpern gegen *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* und *B. afzelii* entwickelt. Der Test verwendet neben dem äußeren Membranprotein OspC und einem internen Teil des p41-Antigens die Antigene p100, VlsE und p18. Dieser Test ist nicht kommerziell erhältlich.

Der Test wurde nach den Herstellerangaben wie folgt durchgeführt:

Alle Reagenzien (siehe Kapitel 12.1) wurden zunächst auf Raumtemperatur gebracht (Entnahme aus dem Kühlschrank etwa 30 Minuten vor Untersuchungsbeginn). Die Kontrollseren, Plasmaproben und Konjugate wurden durch Schütteln gleichmäßig durchgemischt. Dann erfolgte die Herstellung des Waschpuffers und der Konjugatlösung (siehe Kapitel 12.1.3.2). Zu je 1 ml Verdünnungspuffer wurden jeweils 10 µl Pferdeplasma bzw. Positivkontrolle pipettiert entsprechend einer Verdünnung von 1+100. Nach Durchmischung wurden jeweils 100 µl dieser Ansätze sowie der Negativkontrolle in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte pipettiert. Die Cut-off-Kontrolle wurde im Doppelansatz hinzugefügt. Danach wurde die mit Abdeckfolie verschlossene Mikrotiterplatte für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Kavitäten der Mikrotiterplatte wurden im Anschluss an die Inkubation vollständig geleert und viermal mit je 300 µl Waschpuffer gewaschen. Um Flüssigkeitsreste aus den Kavitäten zu entfernen, wurde die Platte nach dem letzten Waschvorgang auf einem Papiertuch ausgeschlagen. Danach wurden von der verdünnten Konjugatlösung jeweils 100 µl pro Kavität pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde erneut abgedeckt und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Der anschließende Waschvorgang wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Nachfolgend wurden 100 µl der gebrauchsfertigen Substratlösung pro Kavität pipettiert und die Mikrotiterplatte bei Raumtemperatur wiederum für 30 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 100 µl Stopplösung pro Kavität beendet. Innerhalb der nächsten 60 min wurde die Extinktionsmessung in einem Mikrotiterplatten-Photometer bei der Wellenlänge 450 nm und der Referenzwellenlänge 650 nm durchgeführt. Die Auswertung erfolgte nach folgendem Schema:

Qualitative Auswertung:

Cut-off (Grenzwert): Extinktionsmittelwert der Cut-off-Kontrolle

Graubereich: untere Grenze = Cut-off

obere Grenze = Cut-off + 20 % (Cut-off x 1,2)

- Proben mit Extinktionswerten oberhalb des Graubereiches = positiv
- Proben mit Extinktionswerten im Graubereich = grenzwertig
- Proben mit Extinktionswerten unterhalb des Graubereiches = negativ

Quantitative Auswertung:

Den Extinktionswerten wird mit Hilfe einer Formel die entsprechende Antikörperaktivität in Units pro ml zugeordnet.

$U/ml \text{ Probe} = (\text{Extinktion Probe} / \text{Extinktion Cut-off}) \times 20$

Graubereich: untere Grenze = 20 U/ml

obere Grenze = 24 U/ml

- $U/ml \text{ Probe} > 24$ = positives Testergebnis
- $\leq 24 \text{ U/ml Probe } 20 \leq$ = grenzwertiges Testergebnis
- $U/ml \text{ Probe} < 20$ = negatives Testergebnis

3.2.2.1.2 Indirekter Immunfluoreszenztest (IFAT)

Der „*Borrelia burgdorferi* sensu lato IFT“ der Firma R-biopharm AG (Vertriebsfirma Dia Consulting) dient dem Nachweis von IgG-Antikörpern gegen *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* und *B. afzelii*. Als Antigene dienen inaktivierte *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* und *B. afzelii*. Der Test war einige Jahre kommerziell erhältlich, wird heute jedoch nicht mehr vertrieben. Er wurde nach den Herstellerangaben wie folgt durchgeführt (siehe Kapitel 12.1):

Die auf zehn Feldern mit Antigen beschichteten Objektträger wurden dem Kühlschrank entnommen und bis zur Erwärmung auf Raumtemperatur zunächst gekennzeichnet und auf einen Objektträgerhalter gelegt. Die Mikrotiterplatten erhielten ebenfalls eine Kennzeichnung bestehend aus Probennummer, Positiv- und Negativkontrolle. Mittels Multikanalpipette wurden je 150 µl Verdünnungspuffer in die Reihe H und je 50 µl in die Reihen G bis A pipettiert.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		Verdünnungspuffer
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	50 µl	„
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	50 µl	„
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	50 µl	„
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	50 µl	„
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	50 µl	„
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	50 µl	„
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	50 µl	„
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	150 µl	

Nun wurden in jede Vertiefung der Reihe H 10 µl Plasma und pro Ansatz in je eine entsprechend markierte Vertiefung einmal eine Positiv- und einmal eine Negativkontrolle pipettiert.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	10 µl Plasma

Dann wurde bei Reihe H beginnend eine geometrische Verdünnungsreihe hergestellt, indem mit einer Multikanalpipette gemischt und jeweils 50 µl in die nächste Reihe überpipettiert wurde.

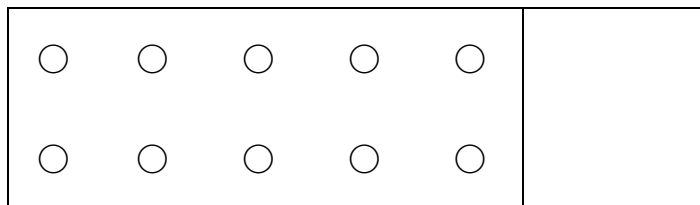
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	↑
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	↑
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	↑
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	↑
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	↑
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	↑
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	↑
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	↑

Mischen und je 50 µl in nächste Reihe überpipettieren

Die Plasmaproben und die Positiv-und Negativkontrollen wurden dabei wie folgt verdünnt:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1:2048
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1:1024
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1:512
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1:256
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1:128
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1:64
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1:32
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	

Im Anschluss wurden jeweils 10 µl verdünntes Plasma auf das entsprechende mit Antigen beschichtete Objektträgerfeld (Objektträger siehe unten) pipettiert, beginnend mit der höchsten Verdünnung von rechts nach links.



Nach der unmittelbar folgenden Inkubation in einer feuchten Kammer im Wärmeschrank bei 37 °C für 30 min wurden die Objektträger in Glasküvetten, die jeweils frischen Waschpuffer (pH-Wert 7,4) enthielten, zunächst gespült und dann zweimal 5 Minuten lang gewaschen. Danach wurden die Objektträger geschüttelt und zum Abtropfen vertikal auf saugfähiges Papier gestellt, so dass eine Restfeuchte erhalten blieb. Nun wurden auf jedes Feld des Objektträgers je 10 µl Konjugat (1:80), mit 0,02 % Evans-Blue/PBS verdünnt (10 µl Anti-horse IgG-FITC + 790 µl 0,02 % Evans-Blue/PBS) aufgetragen. Der Grad der Verdünnung wurde so eingestellt, dass das Auftreten von unspezifischen Fluoreszenzen auf den Antigenfeldern unterdrückt wird. Erneut wurden die Objektträger in einer feuchten Kammer bei 37 °C für 30 min inkubiert und im Anschluss an die Inkubation der Spül- und Waschvorgang wiederholt. Nach dem Schütteln und dem Abtropfen auf saugfähigem Papier wurden die noch feuchten Objektträger mit dem mitgelieferten Eindeckmittel überschichtet. Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 400-facher Vergrößerung.

Gemäß der Herstellervorgabe wurde die Titerstufe 1:64 als Grenzwert festgelegt. Proben, die eine deutliche Fluoreszenz bei Titerstufen über 1:64 zeigten, wurden positiv beurteilt. Die letzte Verdünnungsstufe mit deutlicher Fluoreszenz wurde dabei als Endtiter angegeben. Proben, die keine Fluoreszenz bei diesen Titerstufen aufwiesen, wurden als negativ bewertet.

3.2.2.1.3 RecombBlot Borrelia (Blot M)

Der RecombBlot Borrelia IgG wurde von der Firma Mikrogen für die Identifizierung spezifischer gegen *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* und *B. afzelii* gerichteter Antikörper der Klasse IgG entwickelt. Verwendet werden neben den äußeren Membran-Proteinen OspA und OspC, die Antigene p100, VlsE, p39 und p18, p41 und ein interner Teil des p41 (p41/i). Die Antigene wurden rekombinant produziert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Im Rahmen dieser Studie wurde das Testsystem erstmalig an einem größeren Pferdeblutprobenkollektiv erprobt.

Der Test wurde entsprechend den Herstellervorgaben wie folgt durchgeführt (siehe Kapitel 12.1):

Zunächst wurden in die zehn Vertiefungen der Inkubationsschale je 2 ml Waschpuffer pipettiert. In je eine Vertiefung wurden 8 µl des Probenplasmas zum Waschpuffer gegeben und beide Flüssigkeiten durch vorsichtiges horizontales Schütteln homogenisiert (Verdünnung 1+250). In die nun mit Waschpuffer-Proben-Gemisch gefüllten Vertiefungen wurde vorsichtig je ein mit den oben genannten Antigenen beschichteter Teststreifen mit Hilfe einer Plastikpinzette eingetaucht, dabei wurde darauf geachtet, dass die Streifennummerierung nach oben zeigte und die Streifen vollständig mit Flüssigkeit benetzt und untergetaucht waren. Dann wurden die Inkubationsschalen mit Kunststoffdeckeln abgedeckt und unter leichtem Schütteln zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Flüssigkeit aus den einzelnen Vertiefungen abgesaugt. Anschließend wurden in jede Vertiefung 2 ml des Waschpuffers gegeben und für 5 min unter leichtem Schütteln gewaschen; nach dem Waschvorgang wurde der Waschpuffer abgesaugt.

Der Waschvorgang wurde dreimal wiederholt. Nachfolgend wurden in jede Vertiefung 2 ml der vorbereiteten Konjugatlösung (siehe Kapitel 12.1.3.3) gegeben und abgedeckt unter leichtem Schütteln eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Konjugatlösungen aus den Vertiefungen abgesaugt und ein viermaliger Waschvorgang wie zuvor beschrieben durchgeführt. In jede Vertiefung wurden danach 1,5 ml Substratlösung gegeben und 5 - 10 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Streifen wurden so lange in der Substratlösung belassen, bis bei dem Streifen mit der schwachpositiven Serumkontrolle die p100 Bande zu erkennen war. Nach dem Absaugen der Substratlösung wurden die Streifen dreimal kurz mit deionisiertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden sie vorsichtig mit einer Plastikpinzette aus dem Wasser genommen und zum Trocknen für ca. zwei Stunden zwischen zwei Lagen saugfähigen Papiers gelegt. Die so getrockneten Streifen wurden auf einem Auswertebogen zur Protokollierung der Ergebnisse aufgeklebt. Die Identifizierung des Bandenmusters der Teststreifen erfolgte anhand eines kitspezifischen Kontrollstreifens mit entsprechenden Markierungen.

Die Auswertung der einzelnen Banden wurde nach dem folgenden Schema vorgenommen:

Banden	Intensität
keine Reaktion	-
sehr geringe Intensität	+/-
starke Intensität	+
sehr starke Intensität	++

Tabelle 10: Punktbewertung der *B. burgdorferi*-Antigene im IgG-Blot (Blot M)

Protein/Antigen Molekulargewicht (kDa)	Name	Funktion/Herkunft	Punkte
100	P100	<i>B. afzelii</i>	8
66*	VlsE	Fusionsprotein, repräsentiert die immundominanten VlsE- Epitope von verschiedenen Genospezies	4
41	P41	Flagellin <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	1
39	BmpA	<i>B. afzelii</i>	8
31	OspA	Oberflächenprotein <i>B. afzelii</i>	4
22	OspC	Oberflächenprotein <i>B. garinii</i> 1, <i>B. afzelii</i> , <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto, <i>B. garinii</i> 2	6
20	P41/i	Spezifischer interner Teil des Flagellins <i>B. garinii</i>	1
18,5	P41/i	Spezifischer interner Teil des Flagellins <i>B. afzelii</i>	1
18	P18	Oberflächenprotein <i>B. afzelii</i>	8

*Das VlsE wird als 40 kDa Lipoprotein beschrieben.

Im recomBlot (Fa. Mikrogen) liegt VlsE als Fusionsprotein mit 66 kDa vor.

Das Testergebnis erhält man durch Addition der entsprechenden Punktwerte der einzelnen mit + oder ++ bewerteten Banden. Dabei ist es unerheblich, wie stark die Reaktion ausgefallen ist, die Punktwerte sind für die + und ++ Reaktion gleich. Für die Reaktion der OspCs darf nur einmal der Punktwert berechnet werden, unabhängig davon, welche und wie viele der 3 OspCs reagieren.

Tabelle 11: Beurteilung der Testergebnisse IgG (Blot M)

Summe der Punkte	Beurteilung IgG
≤ 4	negativ
5-6	fraglich
≥ 7	positiv

3.3 Studie zur Überprüfung der Ergebnisse der vorausgegangenen Studie

Zur Überprüfung der divergenten Ergebnisse der vorausgegangenen Studie wurde im Frühjahr 2015 eine Subgruppe mittels eines weiteren Immunblots analysiert. Die Untersuchungen fanden im Labor des Instituts für Infektionsmedizin und Zoonosen (Lehrstuhl Bakteriologie und Mykologie) der LMU statt. Zum Einsatz kam der *Borrelia* Veterinär plus OspA Line IgG Line Immunoblot der Firma Virotech.

3.3.1 Untersuchungsmaterial - Blutproben

Die vorausgegangenen Ergebnisse des Immunblots der Firma Mikrogen und des ELISA der Firma Virotech sollten in dieser Arbeit überprüft werden. Aus diesem Grund wurden für die Subgruppe die Proben der damaligen fünften und sechsten Blutentnahme ausgewählt, da zu diesen Terminen die meisten Proben im Immunblot und übereinstimmend im ELISA V untersucht wurden (siehe Tabelle 9). Von der fünften Blutentnahme, im Folgenden als Blutentnahme A bezeichnet, wurden 96 Proben im Jahr 2015 erneut untersucht. Von der sechsten Blutentnahme, im Folgenden als Blutentnahme B bezeichnet, wurden 73 Proben für die erneute Untersuchung ausgewählt. Sämtliche Jahrgänge der damalig untersuchten Pferde wurden in die Subgruppe einbezogen (siehe Anhang B). Aus der Gruppe der Fohlen wurden 11 Tiere ausgewählt. Aufgrund dieser geringen Anzahl konnten die Proben aller stattgefundenen Blutentnahmen untersucht werden. Während der achten Blutentnahme (siehe Tabelle 9) konnten keine Blutproben bei den Fohlen gewonnen werden. So ergeben sich insgesamt acht Blutentnahmen, die im Folgenden von eins bis acht durchnummeriert werden.

3.3.2 Labordiagnostische Untersuchungen aus dem Jahr 2015

3.3.2.1 *Borrelia* Veterinär plus OspA Line (Blot V)

Der *Borrelia* Veterinär plus OspA Line IgG Line Immunoblot der Firma Sekisui Virotech dient dem qualitativen Nachweis von *B. burgdorferi* sensu lato spezifischen IgG-Antikörpern im Pferdeserum. Verwendung finden die rekombinanten Antigene BmpA (p39), p58 und p83, sowie als Mix die Antigene VlsE, DbpA und OspC. Die Proteine des Erreger-Antigens werden bei diesem Line-Blot durch ein spezielles Sprühverfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Test wurde zusammen mit der Firma Virotech im Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen der LMU München entwickelt und auch dort durchgeführt.

Der Test wurde entsprechend den Herstellervorgaben wie folgt durchgeführt (siehe Kapitel 12.1):

Vor Testbeginn wurden das Verdünnungs-/Waschpufferkonzentrat, das Substrat, die Kontrollen und die Patientenproben auf Raumtemperatur gebracht. Die Seren wurden vor der Benutzung durchmischt und zentrifugiert. Pro Kontrolle bzw. Patientenprobe wurde je ein Teststreifen in die Rinne einer sauberen Inkubationswanne gelegt. Die Teststreifen waren durchnummeriert. Die Teststreifen wurden dabei nur am markierten oberen Ende angefasst. Ein Combitip, mit der Beschriftung „Serumverdünnungspuffer“, wurde auf eine Multipipette gesteckt. Anschließend wurden 1,5 ml eingestellt und je 1,5 ml Verdünnungs-/Waschpuffer in jede Vertiefung pipettiert. Die Teststreifen wurde dabei ausreichend und gleichmäßig mit Flüssigkeit benetzt. Pro Charge wurden 100 µl Cut-off-Kontrolle Pferd und 15 µl Serumkontrolle (0496 Pferd) in eine Vertiefung gegeben. Dann wurden 15 µl der Serumproben (=1:100) in je eine Vertiefung (nicht direkt auf den Streifen) pipettiert. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Kippschüttler. Dann wurde die Flüssigkeit vorsichtig und vollständig in ein Becherglas abgegossen. Mit dem Combitip wurden 1,5 ml Waschpuffer in

jede Schalenrinne pipettiert; für 3 mal 5 min wurde auf dem Schüttler inkubiert. Der Waschpuffer wurde dazwischen immer vollständig abgegossen. Die Konjugatverdünnung wurde kurz vor Gebrauch angesetzt. Mit einem entsprechend beschrifteten Combitip wurden je 1,5 ml Konjugatverdünnung in jede Vertiefung gegeben. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Kipp-schüttler. Wie zuvor beschrieben wurde ein Waschschrift durchgeführt. Dann wurde einmal für ca. 1 min mit Aqua bidest aus der Spritzflasche gewaschen. Die Flüssigkeit wurde vorsichtig und vollständig in ein Becherglas abgegossen. Mit einem entsprechend beschrifteten Combitip wurden 1,5 ml der Substratlösung in jede Vertiefung pipettiert. Es folgte die Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Kippschüttler für 12 min. Dann wurde das Substrat vorsichtig und vollständig in ein Becherglas abge-gossen. Ohne Inkubation wurde dreimal mit 1,5 ml Aqua bidest aus der Spritzflasche gewaschen. Die Flüssigkeit wurde zwischen den Waschgängen vollständig abgekippt. Die Streifen wurden auf Papier trocknen gelassen und anschließend auf ein Dokumentationsblatt geklebt. Die Cut-off-Kontrolle wurde zur besseren Vergleichbarkeit auf ein separates Dokumentationsblatt geklebt. (IgG Pferd Cut-off-Bande: VlsE-Mix).

Die Auswertung erfolgte nach dem folgenden Schema:

Tabelle 12: Auswertekriterien (IgG Beurteilung) beim Pferd (Blot V)

Pferd	Befund	Interpretation
0 Banden oder Banden < cut off	negativ	kein Hinweis auf Erregerkontakt

VlsE-horse	Befund	Interpretation
+0 - 2 Banden	grenzwertig	Hinweis auf Erregerkontakt
+ ≥ 3 Banden	Infektion	Hinweis auf Infektion

Sonderfall	Befund	Interpretation
VlsE-horse + DbpA + 1 Bande	Infektion	Hinweis auf Infektion

ohne VlsE-horse	Befund	Interpretation
0 – 2 Banden	negativ	kein Hinweis auf Erregerkontakt
3 Banden	grenzwertig	Hinweis auf Erregerkontakt
≥ 4 Banden	Infektion	Hinweis auf Infektion

(Angaben grundsätzlich für Banden ≥ cut-off-Bandenintensität)

3.4 Direkter Erregernachweis - Untersuchung der Zecken

Die Untersuchung der Zecken (siehe Kapitel 3.2.1.3) mittels Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (Real-Time PCR) wurde im Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie, LMU, durchgeführt.

3.4.1 DNA-Extraktion

Die DNAExtraktion wurde mit dem QIAamp® DNA Mini Kit („tissue protocol“) der Firma QIAGEN GmbH, Hilden, nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt (siehe Kapitel 12.1):

Jede Zecke wurde einzeln in je ein Reaktionsgefäß mit einer Metallkugel gegeben, dazu wurden 80 µl PBS-Puffer pipettiert. Die Gefäße wurden verschlossen zur mechanischen Zerkleinerung bzw. Homogenisierung der Zecken für fünf Minuten bei 30.000 x g in den Tissue-Lyser verbracht. Im Anschluss wurden je 100 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase-K zu den Ansätzen pipettiert, mittels Vortexer gemixt und schließlich vier Stunden lang bei 56 °C im Thermomixer inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation wurden je 200 µl AL-Puffer zu den Ansätzen gegeben und 15 Sekunden mittels Vortexer gemixt. Es folgte eine erneute Inkubation im Thermomixer bei 70 °C für 10 min. Danach wurden die Reaktionsgefäße kurz zentrifugiert, 200 µl Ethanol wurden hinzu pipettiert, die Proben für 15 s mittels Vortexer gemischt und nochmals zentrifugiert.

Die Mischung wurde anschließend auf Spinsäulen, die sich in 2 ml-Sammelgefäßen befanden, gegeben. Diese wurden verschlossen bei 8000 x g eine Minute zentrifugiert. Danach wurden sie in neue 2 ml-Sammelgefäße umgesetzt. Die ersten Sammelgefäße wurden mitsamt Filtrat verworfen. Nach dem Öffnen der Spinsäulen wurden 500 µl AW1-Puffer hinzupipettiert. Sie wurden wiederum verschlossen und eine Minute bei 8.000 x g zentrifugiert, um sie im Anschluss erneut in frische 2 ml-Sammelgefäße umzusetzen und die benutzten Sammelgefäße samt Inhalt zu verwerfen. Danach wurden 500 µl AW2-Puffer zu den Spinsäulen hinzupipettiert und verschlossen bei 13.000 x g 3 min lang zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde mit Wechsel des Sammelgefäßes einmal wiederholt. Abschließend wurden die Spinsäulen in 1,5 ml Safe-Lock-Gefäßen verbracht, 200 µl AE-Puffer wurden in die Säulen gegeben, der Deckel verschlossen und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 8.000 x g wurde die Spinsäule verworfen. Das Eluat in den Safe-Lock-Gefäßen wurde bei -20 °C bis zur Durchführung der PCR gelagert.

3.4.2 Real-Time PCR

Die Real-Time PCR wurde durch das technische Personal des Institutes für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie nach dem dort etablierten Protokoll von Schwaiger durchgeführt (Schwaiger et al., 2001). Darin wird ein 170 Basenpaare-umfassender Abschnitt des chromosomalen Flagellin-Gens amplifiziert. Die Spezifität dieser PCR erlaubt die Detektion aller in Europa klinisch relevanten Spezies des *B. burgdorferi* sensu lato-Komplexes, *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* und *B. garinii*, sowie *B. valaisiana*, deren Pathogenität noch nicht geklärt ist. Kreuzreaktionen mit anderen Bakterien, Viren und Pilzen sind ausgeschlossen. Das Protokoll erlaubt, dass die oben genannten *Borrelien* spp., bzw. deren Isolate, mit einer vergleichbaren Sensitivität nachweisbar sind (Schwaiger et al., 2001). Die Reaktionsansätze (siehe Kapitel 12.1) wurden gemäß Tabelle 12 unter Verwendung von jeweils

5 µl DNA-Extrakt der zu untersuchenden Zecken hergestellt, die Negativkontrolle enthielt dasselbe Volumen an destilliertem Wasser, als Positivkontrolle wurden die Spezies *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* und *B. garinii* mitgeführt.

Die Reaktionsbedingungen wurden am Real-Time PCR-Gerät (iCycler) gemäß Tabelle 13 eingestellt. Bei jedem Real-Time PCR-Lauf wurden zusätzlich zu den Zeckenproben jeweils eine Negativ- und eine Positivkontrolle mitgeführt.

Tabelle 13: Reaktionsansatz für die PCR (nach Schwaiger et al., 2001)

Inhaltsstoff	Volumen (25 µl)	Konzentration
PCR mix (10 x)	2,5 µl	50 mM KCl 10 µM EDTA 10 mM Tris-HCl 1,5 mM MgCl ₂
dNTPs (10 mM)	0,5 µl	0,2 mM
Taq (Qiagen)	0,2 µl	1 U/25 µl
MgCl ₂ -Zusatz (25 mM)	2,00 µl	3,5 mM
Primer :		
FlaF1A (20 µM)	0,375 µl	0,3 µM
FlaR1 (20 µM)	1,125 µl	0,9 µM
Fla probe (20 µM)	0,25 µl	0,2 µM
H ₂ O (5 mM MgCl ₂)	13,05 µl	-
DNA-Extrakt/Template	je 5,00 µl	variabel

Tabelle 14: Reaktionsbedingungen für die PCR(nach Schwaiger et al., 2001)

Reaktion	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Hot-Start-Aktivierung der Polymerase	95 °C	10 min	1 x
Denaturierung	95 °C	30 s	55 x
Annealing-Elongation	60 °C	60 s	

Befundbegutachtung: Angegeben wird die Nachweisbarkeit der DNA des Erregers im Vergleich mit je einer Positiv- und Negativkontrolle. Als positiver Nachweis gilt die Beobachtung eines exponentiellen Anstiegs der Kurve vor Ct 40.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der vorausgegangenen Arbeit aus dem Jahr 2007

4.1.1 Vergleich der Testsysteme IFAT, ELISA V, ELISA M und Blot M

Um die Testsysteme miteinander vergleichen zu können, wurden ihre serologischen Ergebnisse in sechs Vierfeldertafeln gegenübergestellt (Tabellen 17 bis 22). Pro Tafel wurden je zwei Testsysteme miteinander verglichen. Die Anzahl der positiv und negativ bewerteten Proben wurde in absoluter und relativer Häufigkeit angegeben. In den Vergleich wurden nur Proben einbezogen, die mit beiden gegenüberstehenden Tests untersucht wurden. Als Ähnlichkeitsmaß wurde der Matching-Koeffizient (M-Koeffizient) verwendet. Seine Berechnungsformel lautet:

$$\text{Matching-Koeffizient} = \frac{a+d}{a+b+c+d}$$

(für a stehen in den nachstehenden Tabellen 17 – 22 die Werte des Merkmals negativ/negativ, für b positiv/negativ, für c negativ/positiv und für d positiv/positiv).

Er gibt an, wie groß die Kongruenz der jeweiligen serologischen Ergebnisse ist. Je höher sein Wert ist, umso mehr stimmen die Ergebnisse beider Tests überein. Bei dem Wert 0 gibt es keinerlei Übereinstimmung, der Wert 1 ist gleichbedeutend mit vollständiger Übereinstimmung. Zur Interpretation konkreter Werte werden in der Literatur Richtwerte angegeben, beispielsweise folgende (Altman, D.G., 1991):

Tabelle 15: Richtwerte zur Interpretation des Matching-Koeffizienten

Wert des Matching-Koeffizienten	Stärke der Übereinstimmung
< 0,20	schwach
0,21 – 0,40	leicht
0,41 – 0,60	mittelmäßig
0,61 – 0,80	gut
0,81 – 1,00	sehr gut

Die größte Übereinstimmung besteht zwischen dem ELISA und Immunblot (beide Firma Mikrogen) bei einem M-Koeffizient von 0,74 (Tabelle 22). Die Gegenüberstellung vom IFAT und dem Mikrogen ELISA ergibt einen M-Koeffizienten von 0,71 (Tabelle 18), die vom IFAT und dem Blot M einen Wert von 0,70 (Tabelle 19).

Geringere Übereinstimmungen ergibt die Berechnung der M-Koeffizienten für den Virotech ELISA mit den übrigen Testsystemen. Der Vergleich mit dem Immunblot liefert einen Wert von 0,41 (Tabelle 21), jener mit dem IFAT einen Wert von 0,38 (Tabelle 17). und die direkte Gegenüberstellung mit dem Mikrogen ELISA ergibt einen M-Koeffizienten von 0,30 (Tabelle 20).

Tabelle 16: IFAT und ELISA V

	Ergebnisse absolut			Ergebnisse in %		
	ELISA V negativ	ELISA V positiv	gesamt	ELISA V negativ	ELISA V positiv	gesamt
IFAT negativ	320	3	323	32,79	0,31	33,10
IFAT positiv	601	52	653	61,57	5,33	66,90
gesamt	921	55	976	94,36	5,64	100,00
Matching Koeffizient	0,38					

Tabelle 17: IFAT und Elisa M

	Ergebnisse absolut			Ergebnisse in %		
	ELISA M negativ	ELISA M positiv	gesamt	ELISA M negativ	ELISA M positiv	gesamt
IFAT negativ	79	104	183	11,72	15,43	27,15
IFAT positiv	90	401	491	13,35	59,50	72,85
gesamt	169	505	674	25,07	74,93	100,00
Matching Koeffizient	0,71					

Tabelle 18: IFAT und Blot

	Ergebnisse absolut			Ergebnisse in %		
	Blot M negativ	Blot M positiv	gesamt	Blot M negativ	Blot M positiv	gesamt
IFAT negativ	122	78	200	15,70	10,04	25,74
IFAT positiv	151	426	577	19,43	54,83	74,26
gesamt	273	504	777	35,13	64,87	100,00
Matching Koeffizient	0,70					

Tabelle 19: ELISA V und ELISA M

	Ergebnisse absolut			Ergebnisse in %		
	ELISA M negativ	ELISA M positiv	gesamt	ELISA M negativ	ELISA M positiv	gesamt
ELISA V negativ	164	465	629	24,4	69,20	93,60
ELISA V positiv	4	39	43	0,60	5,80	6,40
gesamt	168	504	672	25,00	75,00	100,00
Matching Koeffizient	0,30					

Tabelle 20: ELISA V und Blot M

	Ergebnisse absolut			Ergebnisse in %		
	Blot M negativ	Blot M positiv	gesamt	Blot M negativ	Blot M positiv	gesamt
ELISA V negativ	269	456	725	34,75	58,91	93,66
ELISA V positiv	3	46	49	0,39	5,94	6,33
gesamt	272	502	774	35,14	64,85	100,00
Matching Koeffizient	0,41					

Tabelle 21: ELISA M und Blot M

	Ergebnisse absolut			Ergebnisse in %		
	Blot M negativ	Blot M positiv	gesamt	Blot M negativ	Blot M positiv	gesamt
ELISA M negativ	116	56	172	16,91	8,16	25,07
ELISA M positiv	122	392	514	17,78	57,14	74,92
gesamt	238	448	686	34,69	65,30	100,00
Matching Koeffizient	0,74					

Tabelle 22: Testsysteme IFAT, ELISA V, ELISA M und Blot M im Vergleich

Testsysteme im Vergleich		Gesamtzahl der un- tersuchten Proben	Matching Ko- effizient
ELISA Mikrogen	Blot M	686	0,74
IFAT	ELISA Mikrogen	674	0,71
IFAT	Blot M	777	0,70
ELISA Virotech	Blot M	774	0,41
IFAT	ELISA Virotech	976	0,38
ELISA Virotech	ELISA Mikrogen	672	0,30

*Auswahl der Proben siehe Kapitel 3.2.2.1 und Anhang B

4.2 Ergebnisse der nachfolgend untersuchten Subgruppe aus dem Jahr 2015

4.2.1 Vergleich zwischendem Virotech-Blot und dem Mikrogen-Blot

4.2.1.1 Gegenüberstellung der Testergebnisse des Virotech-Blots und des Mikrogen-Blots

Im Folgenden wurden die Testergebnisse der Subgruppe, die im Frühjahr 2015 mittels des Virotech-Blots untersucht wurde, den Testergebnissen des Mikrogen-Blots gegenübergestellt. Die Testergebnisse des Mikrogen-Blots wurden im Jahr 2007 ermittelt. Bei beiden Tests wurde jeweils dieselbe Pferdegruppe untersucht.

4.2.1.1.1 Gegenüberstellung der Testergebnisse der gesamten Pferde im Virotech-Blot und im Mikrogen-Blot

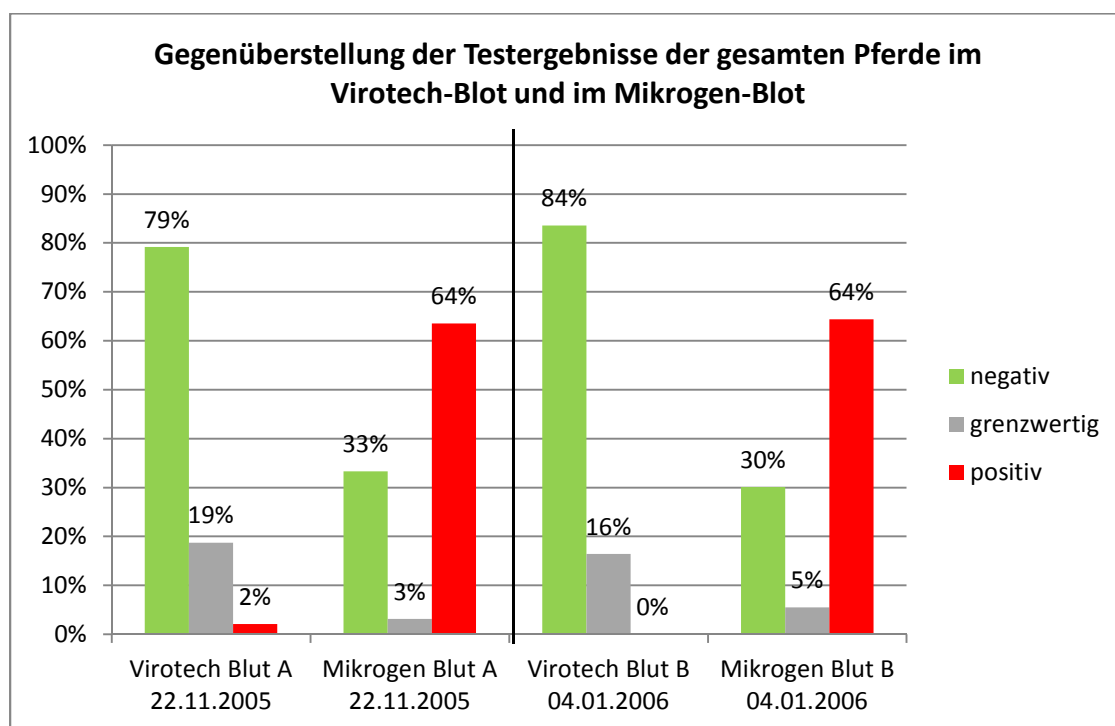


Abbildung 5: Gegenüberstellung der Testergebnisse der gesamten Pferde im Virotech-Blot und im Mikrogen-Blot

Tabelle 23: Übereinstimmungen der Testergebnisse der gesamten Pferde im Virotech-Blot und im Mikrogen-Blot

	Blut A		Blut B	
	Blot Virotech	Blot Mikrogen	Blot Virotech	Blot Mikrogen
n	96	96	73	73
Übereinstimmung	33		22	
Keine Übereinstimmung	63		51	

4.2.1.1.2 Gegenüberstellung der Testergebnisse der Fohlen im Virotech-Blot und im Mikrogen-Blot

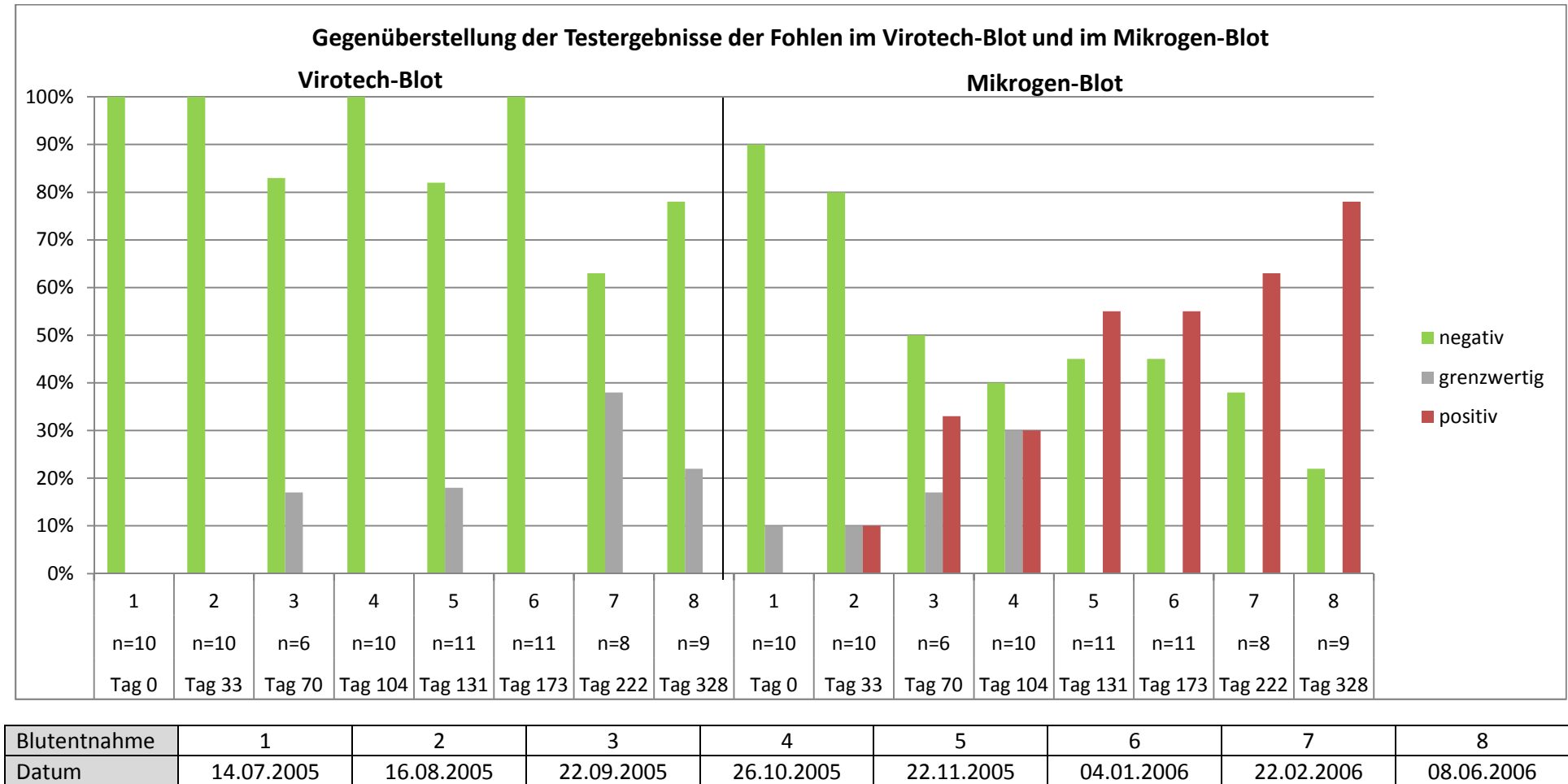



Abbildung 6: Gegenüberstellung der Testergebnisse der Fohlen im Virotech-Blot und im Mikrogen-Blot


Tabelle 24: Übereinstimmungen der Testergebnisse der Fohlen im Virotech-Blot und im Mikrogen-Blot


Blut	1	2	3	4	5	6	7	8
Übereinstimmung	9	8	3	4	5	5	3	2
Keine Übereinstimmung	1	2	3	6	6	6	5	7

4.2.1.2 Gegenüberstellung der Bandenmuster des Virotech-Blots und des Mikrogen-Blots

Um die Bandenmuster der Blots der Firma Virotech und der Firma Mikrogen vergleichen zu können, wurden die Testergebnisse von sechs exemplarisch ausgewählten Pferden graphisch dargestellt. Dabei wurden drei Pferde des Jahrgangs 2004 und drei Pferde des Jahrgangs 2005 (Fohlen) einbezogen.

 = -

 = +

 = ++

4.2.1.2.1 Gegenüberstellung der Bandenmuster von drei exemplarisch ausgewählten Pferden

- Pferd 23208 (Warmblut männlich Jahrgang 2004)

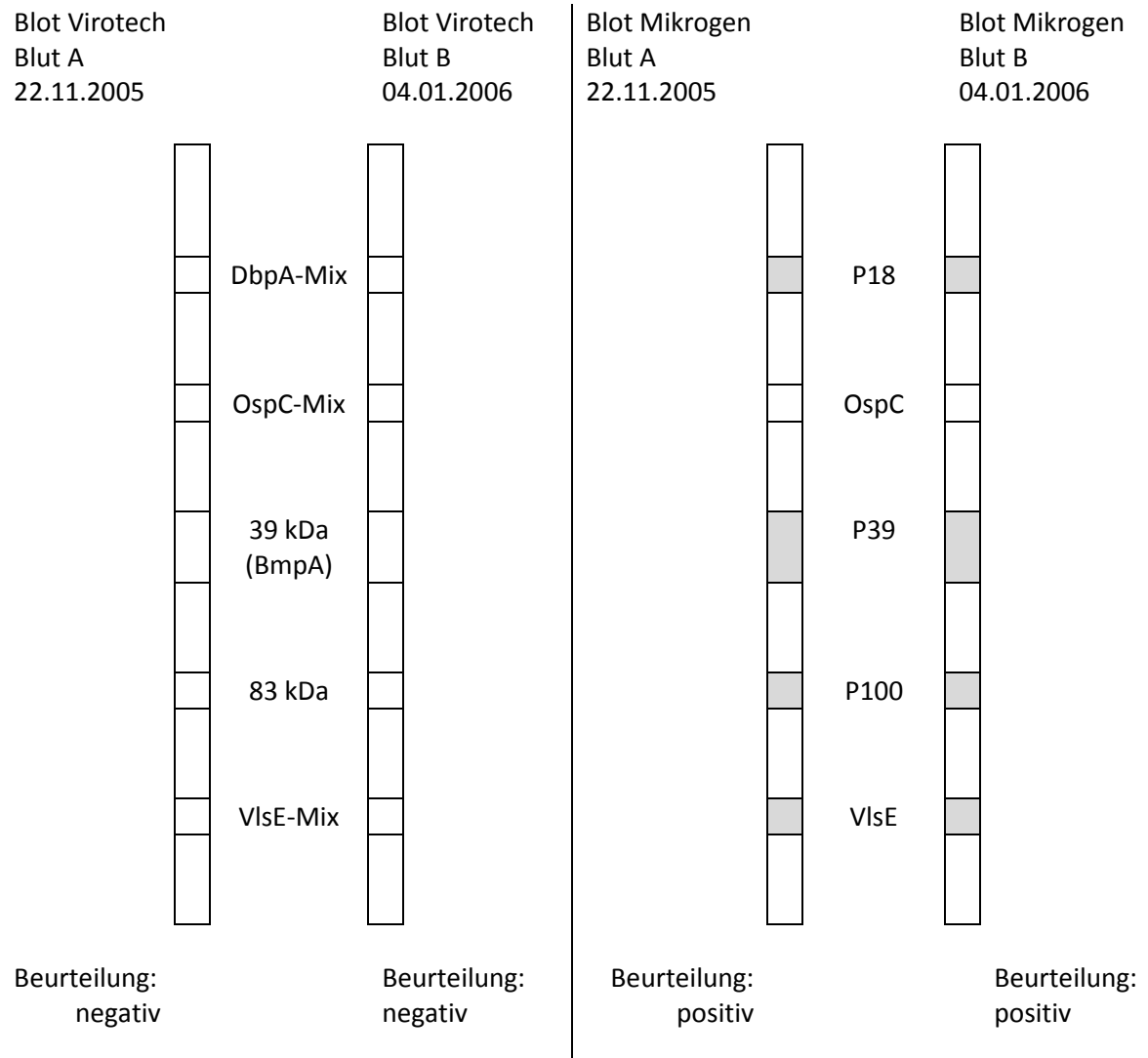


Abbildung 7: Gegenüberstellung der Bandenmuster des Virotech-Blots und des Mikrogen-Blots des Pferdes 23208

- Pferd 25989 (Warmblut männlich Jahrgang 2004)

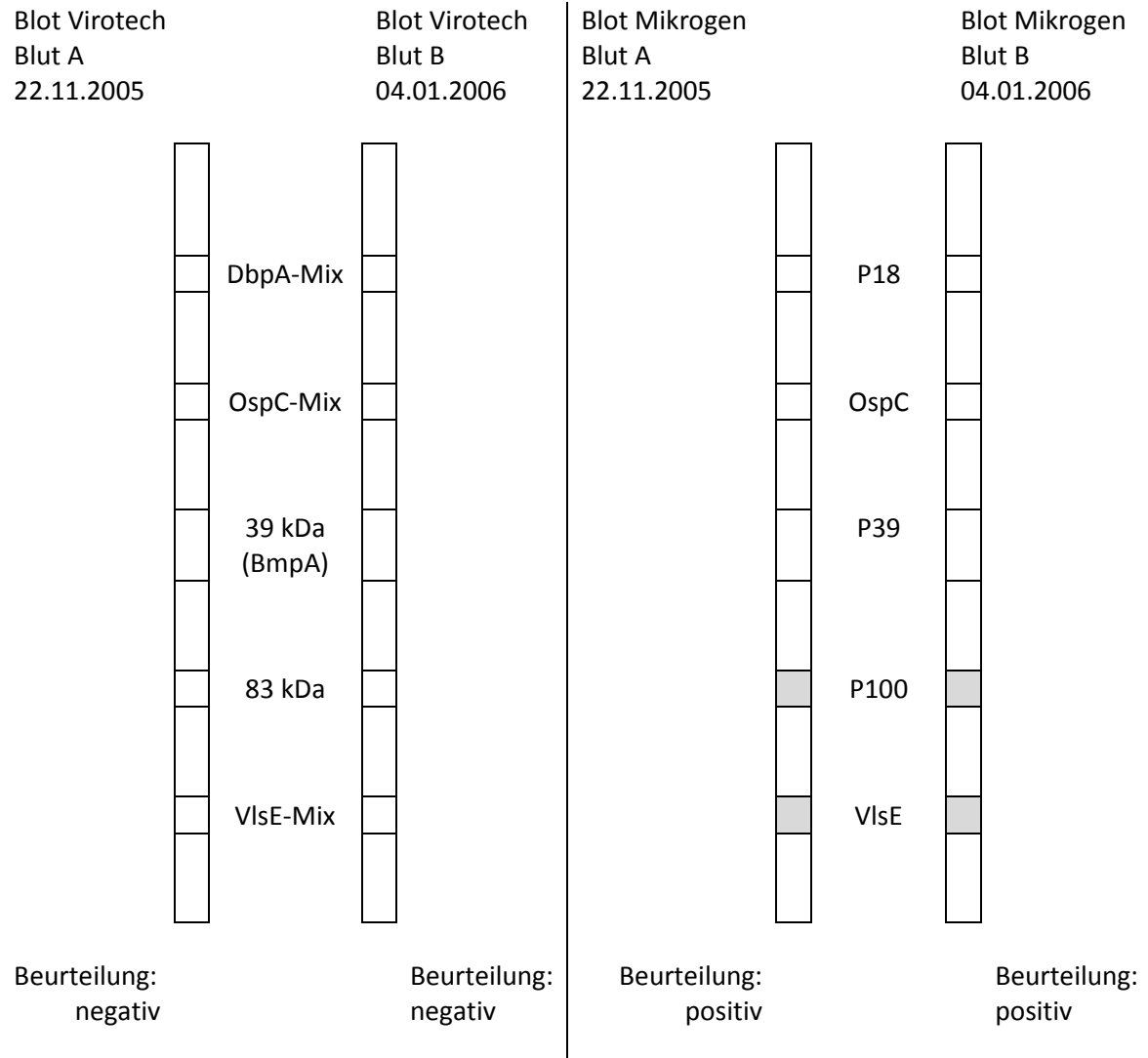


Abbildung 8: Gegenüberstellung der Bandenmuster des Virotech-Blots und des Mikrogen-Blots des Pferdes 25989

- Pferd Shogun (Warmblut männlich 2001)

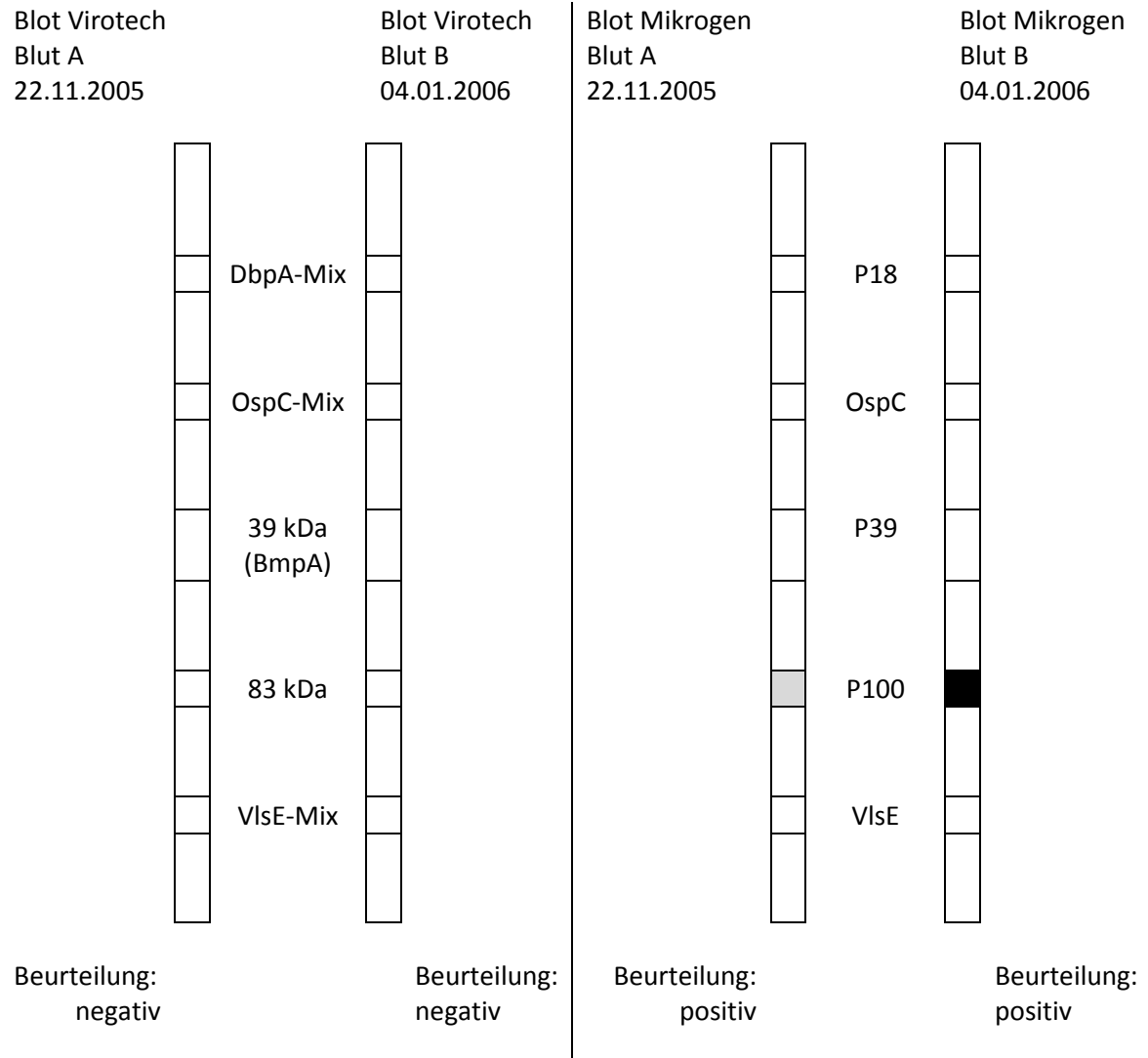


Abbildung 9: Gegenüberstellung der Bandenmuster des Virotech-Blots und des Mikrogen-Blots des Pferdes Shogun

4.2.1.2.2 Gegenüberstellung der Bandenmuster von drei exemplarisch ausgewählten Fohlen

- Fohlen aus der Atlanta (Warmblut weiblich 2005)

Blot Virotech

	Blut 1 14.07.05	Blut 2 -	Blut 3 -	Blut 4 26.10.05	Blut 5 22.11.05	Blut 6 04.01.06	Blut 7 22.02.06	Blut 8 08.06.06
DbpA-Mix								
OspC-Mix								
39 kDa (BmpA)								
83 kDa								
VlsE-Mix								
Beurteilung:	negativ			negativ	grenzwertig	negativ	grenzwertig	grenzwertig

Blot Mikrogen

	Blut 1 14.07.05	Blut 2 -	Blut 3 -	Blut 4 26.10.05	Blut 5 22.11.05	Blut 6 04.01.06	Blut 7 22.02.06	Blut 8 08.06.06
P18								
OspC								
P39								
P100								
VlsE								
Beurteilung:	negativ			grenzwertig	positiv	positiv	positiv	positiv

Abbildung 10: Gegenüberstellung der Bandenmuster des Virotech-Blots und des Mikrogen-Blots des Fohlens aus der Atlanta

- Fohlen aus der Givenchy (Warmblut männlich 2005)

Blot Virotech

	Blut 1 14.07.05	Blut 2 16.08.05	Blut 3 22.09.05	Blut 4 26.10.05	Blut 5 22.11.05	Blut 6 04.01.06	Blut 7 22.02.06	Blut 8 08.06.06
DbpA-Mix								
OspC-Mix								
39 kDa (BmpA)								
83 kDa								
VlsE-Mix								
Beurteilung:	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ

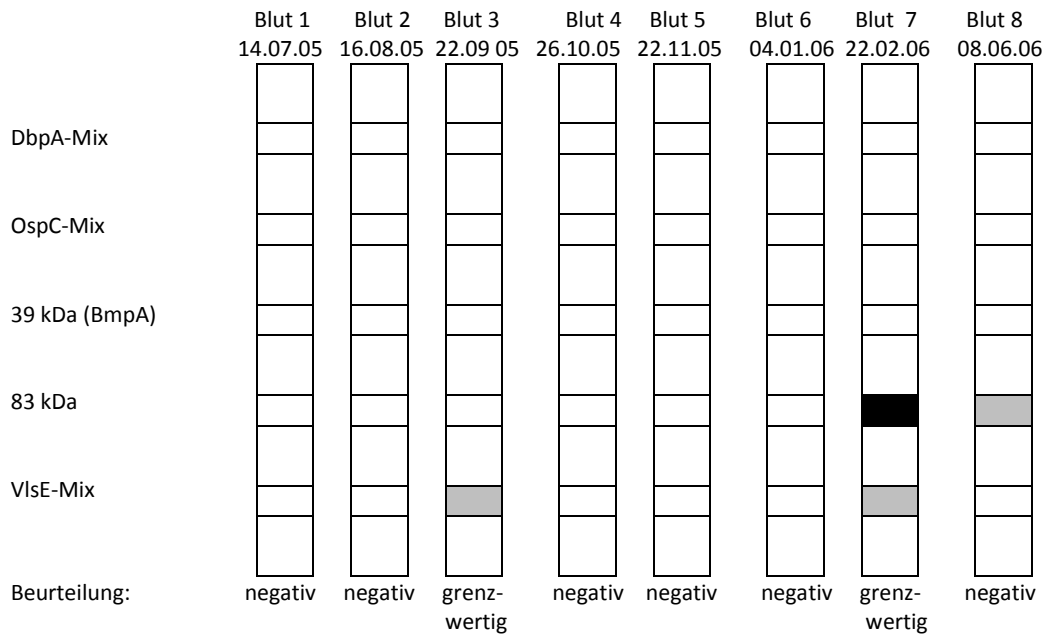
Blot Mikrogen

	Blut 1 14.07.05	Blut 2 16.08.05	Blut 3 22.09.05	Blut 4 26.10.05	Blut 5 22.11.05	Blut 6 04.01.06	Blut 7 22.02.06	Blut 8 08.06.06
P 18								
OspC								
P 39								
P 100								
VlsE								
Beurteilung:	negativ	negativ	grenz- wertig	grenz- wertig	positiv	positiv	positiv	positiv

Abbildung 11: Gegenüberstellung der Bandenmuster des Virotech-Blots und des Mikrogen-Blots des Fohlens aus der Givenchy

• **Fohlen aus der Sunset (Warmblut weiblich 2005)**

Blot Virotech



Blot Mikrogen

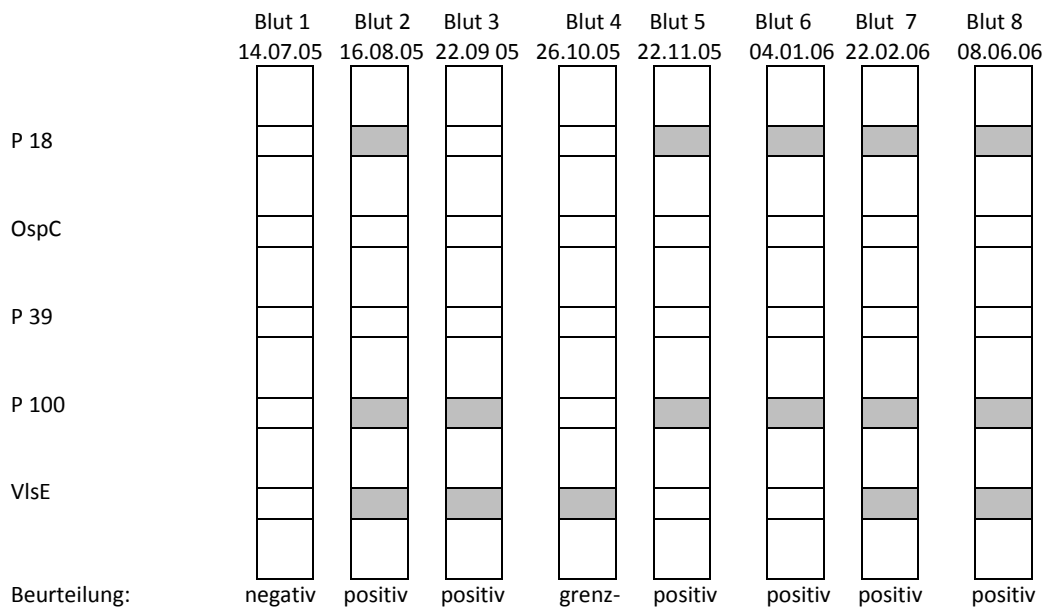


Abbildung 12: Gegenüberstellung der Bandenmuster des Virotech-Blots und des Mikrogen-Blots des Fohlens aus der Sunset

4.2.2 Vergleich zwischen dem Virotech-Blot und dem Virotech ELISA

4.2.2.1 Gegenüberstellung der Testergebnisse des Virotech-Blots und des Virotech-ELISA

Im Folgenden wurden die Testergebnisse der Subgruppe, die im Frühjahr 2015 mittels des Virotech-Blots untersucht wurde, den Testergebnissen des Virotech ELISA gegenübergestellt. Die Testergebnisse des Virotech ELISA wurden im Jahr 2007 ermittelt. Bei beiden Tests wurde jeweils dieselbe Pferdegruppe untersucht.

Tabelle 25: Testergebnisse aller untersuchten Pferdeseren im Virotech-Blot und im Virotech-ELISA

Beurteilung	Pferdeseren (n=222)	
	Virotech-Blot	Virotech-ELISA
negativ	184	195
grenzwertig	36	14
positiv	2	13

4.2.2.1.1 Gegenüberstellung der Testergebnisse der gesamten Pferde im Virotech-Blot und im Virotech-ELISA

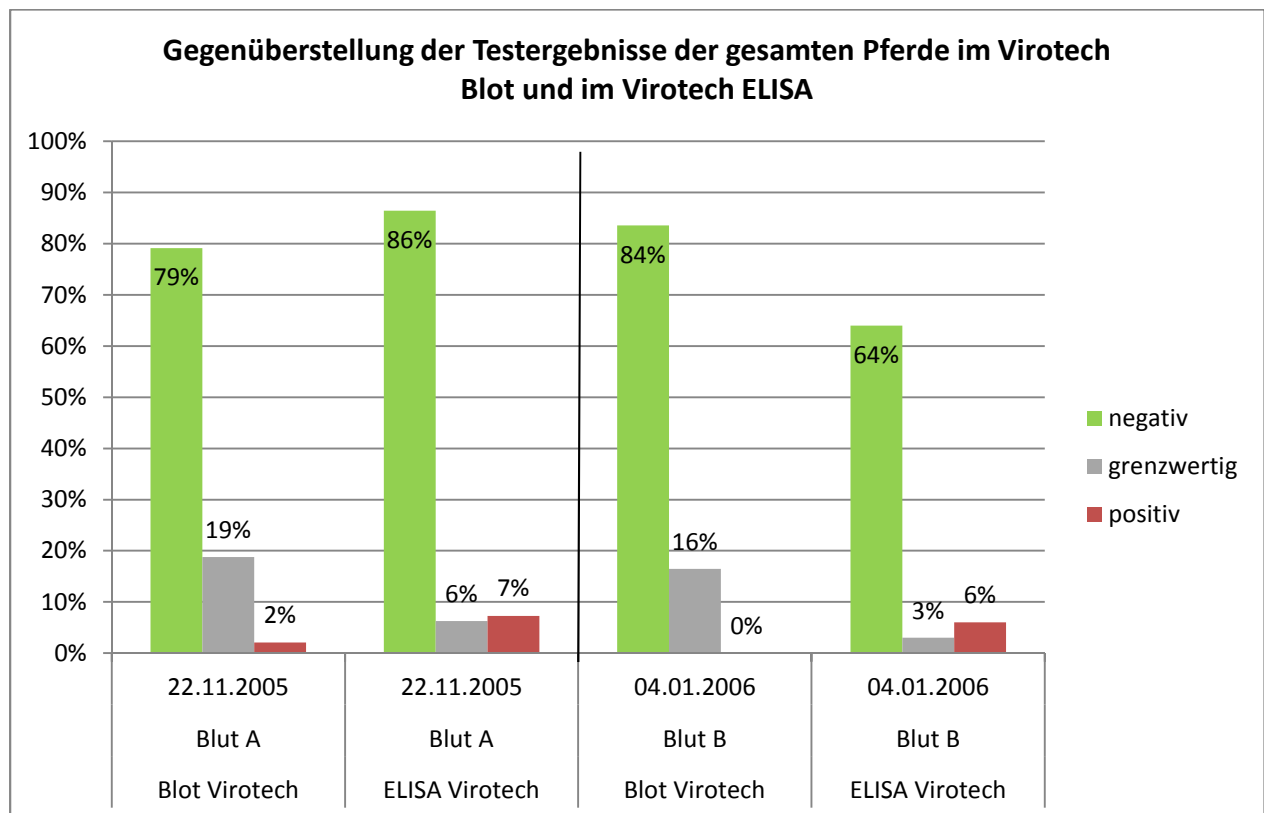


Abbildung 13: Gegenüberstellung der Testergebnisse der gesamten Pferde im Virotech-Blot und im Virotech-ELISA

Tabelle 26: Übereinstimmungen der Testergebnisse der gesamten Pferde im Virotech-Blot und im Virotech-ELISA

	Blut A		Blut B	
	Blot Virotech	ELISA Virotech	Blot Virotech	ELISA Virotech
n	96	96	73	73
Übereinstimmung	72		58	
Keine Übereinstimmung	24		15	

4.2.2.1.2 Gegenüberstellung der Testergebnisse der Fohlen im Virotech-Blot und im Virotech-ELISA

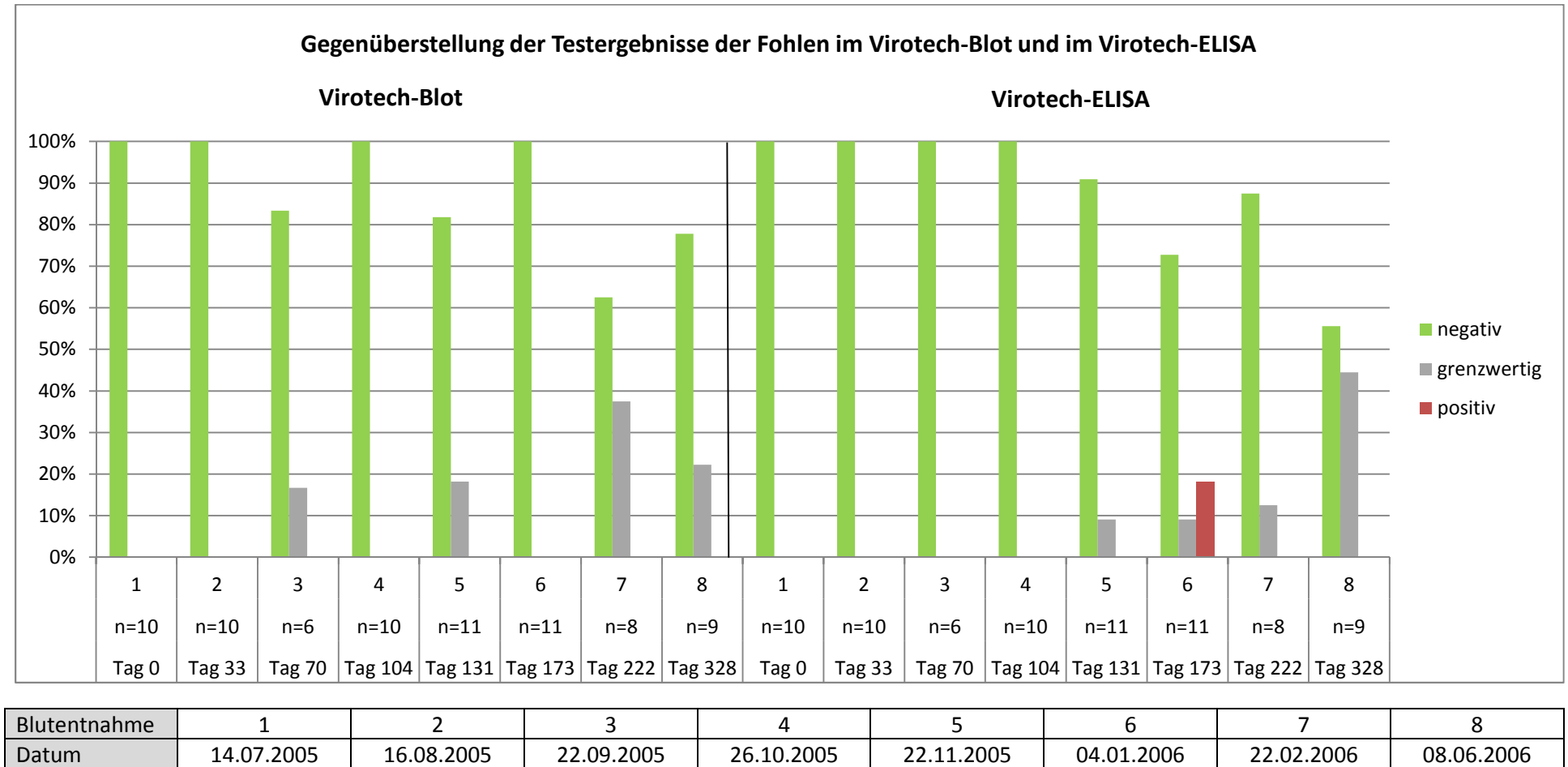


Abbildung 14: Gegenüberstellung der Testergebnisse der Fohlen im Virotech-Blot und im Virotech-ELISA

Tabelle 27: Übereinstimmungen der Testergebnisse der Fohlen im Virotech-Blot und im Virotech-ELISA

Blut	1	2	3	4	5	6	7	8
Übereinstimmung	10	10	5	10	8	8	6	5
Keine Übereinstimmung	0	0	1	0	3	3	2	4

4.3 Prävalenz von *Borrelia burgdorferi* in Zecken des Gestütsgebietes

Die Prävalenz von *Borrelia burgdorferi* in Zecken der Spezies *Ixodes ricinus* in der Umgebung der untersuchten Pferde wurde anhand der Untersuchung von 100 adulten Exemplaren, die von den Weiden des Gestüts Schwaiganger gesammelt wurden (siehe Kapitel 3.2.1.3), geschätzt. Mittels Real-Time PCR waren bei 18 dieser Zecken spezifische Gensequenzen von *Borrelia burgdorferi* nachweisbar, die geschätzte Prävalenz beträgt demzufolge 18 % mit einer oberen bzw. unteren Konfidenzgrenze von 26 % bzw. 10 % bei einer angenommenen statistischen Sicherheit von 95 %.

Tabelle 28: Prävalenz von *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*

Ergebnisse	
n	100
positiv	18
negativ	82

5 Diskussion

Das übergeordnete Ziel dieser Studie war die Überprüfung der diagnostischen Eignung serologischer Untersuchungsmethoden, die zur Abklärung klinischer Verdachtsfälle equiner Lyme-Borreliose in der tierärztlichen Praxis Einsatz finden. Die divergierenden Ergebnisse einer vorausgegangenen eigens durchgeführten Untersuchung waren der Grund für dieses Vorhaben.

Eine im Jahr 2005 gestartete Studie sollte Aufschlüsse über die Immunantwort klinisch gesunder Pferde unterschiedlichen Alters und Geschlechts sowie unterschiedlicher Rassezugehörigkeit und Vektorexposition im jahreszeitlichen Verlauf erbringen. Zu diesem Zweck wurde eine Blutprobenentnahme bei Pferden des Haupt- und Landgestüts Schwaiganger zwischen Juli 2005 und Juni 2006 in vier- bis sechswöchigen Abständen durchgeführt. Die genommenen Blutproben wurden mittels eines IFAT, zwei verschiedener ELISA und einem Immunblot auf *Borrelia burgdorferi* s.l. untersucht. Allgemein ließen sich große Diskrepanzen in den serologischen Ergebnissen erkennen, so dass Aussagen über die Immunantwort klinisch gesunder Pferde unterschiedlichen Alters und Geschlechts sowie unterschiedlicher Rassezugehörigkeit und Vektorexposition im jahreszeitlichen Verlauf nur unzuverlässig zu treffen waren.

Zur Überprüfung der divergierenden Testergebnisse wurde im Frühjahr 2015 eine Subgruppe, deren Blutproben bereits 2007 untersucht wurden, erneut mittels eines weiteren Immunblots untersucht. Da die gegenwärtige Empfehlung zur serologischen Diagnostik der Lyme-Borreliose sowohl in der Human- als auch der Tiermedizin das Prinzip des Zweistufentests vorsieht (Wilske et al., 2007; Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, 2008; Robert-Koch-Institut, 2013), wurden die neu gewonnenen Testergebnisse jenen des im Jahr 2007 durchgeführten Blots der Firma Mikrogen und des ELISA der Firma Virotech gegenübergestellt und verglichen.

5.1 Betrachtung der Testergebnisse aus dem Jahr 2007

Um die Testsysteme miteinander vergleichen zu können, wurden ihre serologischen Ergebnisse in Vierfeldertafeln gegenübergestellt. Als Ähnlichkeitsmaß wurde der Matching-Koeffizient (M-Koeffizient) verwendet (siehe Kapitel 4.1.1). Die größte Übereinstimmung der Testergebnisse findet man im Vergleich zwischen dem ELISA M und dem Immunblot, bei dem der Matching-Koeffizient 0,74 beträgt. Gemäß der Richtwerttabelle zur Interpretation des Matching-Koeffizienten (siehe Kapitel 4.1.1) liegt zwar eine gute Übereinstimmung vor, bei diagnostischen Tests ist dieser Wert jedoch als schlecht zu bewerten und nicht akzeptabel. Vielmehr weist dieser Wert auf eine mangelhafte Aussagekraft der Testsysteme hin. Die Gegenüberstellung des IFAT mit dem ELISA und dem Immunblot der Firma Mikrogen liefert annähernd gleiche Werte (M-Koeffizient von 0,71 und 0,70). Bei den Vergleichen des ELISA der Firma Virotech mit den anderen Untersuchungssystemen lassen sich große Diskrepanzen in den serologischen Ergebnissen erkennen. So erreicht der Vergleich mit dem Immunblot einen Wert von 0,41, jener mit dem IFAT einen Wert von 0,38. Die direkte Gegenüberstellung mit dem Mikrogen ELISA ergibt lediglich einen M-Koeffizienten von 0,30. Die Stärke der Übereinstimmung ist somit nur leicht bis mittelmäßig.

Die divergenten Ergebnisse dieser vorausgegangenen Arbeit lassen keine zuverlässigen Aussagen über die Seroprävalenz von *B. burgdorferi* im Pferdebestand des Bayerischen Haupt- und Landgestüts Schwaiganger zu und bedürfen einer Überprüfung.

5.2 Betrachtung der Testergebnisse der Subgruppe aus dem Jahr 2015

Zur Überprüfung der vorangegangenen Testergebnisse wurde im Jahr 2015 der Line Immuno Assay (LIA) eingesetzt, der zusammen mit der Firma Virotech im Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen entwickelt wurde. Dabei wurden 96 Proben der fünften Blutentnahme (Blutentnahme A) und 73 Proben der sechsten Blutentnahme (Blutentnahme B), sowie die Proben einer ausgewählten Fohlengruppe, bestehend aus 11 Tieren, des Jahrgangs 2005 (Blutentnahmen eins bis acht) untersucht. Sämtliche Proben wurden bereits 2007 im RecombiBlot der Firma Mikrogen und im ELISA der Firma Virotech untersucht. Da seinerzeit die meisten untersuchten Proben der fünften und sechsten Blutentnahme entstammten, wurden diese erneut für die Subgruppe ausgewählt (siehe Kapitel 3.2.1.1). Aufgrund der geringen Anzahl der Fohlenblutproben konnten die Proben aller stattgefundenen Blutentnahmen untersucht werden. Die Testergebnisse des Virotech-Blots werden im Folgenden mit jenen des Mikrogen-Blots und des Virotech-ELISA verglichen.

5.2.1 Gegenüberstellung der Testergebnisse des Virotech-Blots und des Mikrogen-Blots

Die Gegenüberstellung der Testergebnisse des Virotech-Blots und des Mikrogen-Blots der gesamten Pferde zeigt auf den ersten Blick, dass im Mikrogen-Blot eine deutliche Mehrheit der Proben positiv bewertet wird (siehe Kapitel 4.2.1.1.1). Bei der Blutentnahme A reagieren im Virotech-Blot 2 % der Pferde positiv, beim Mikrogen-Blot sind es hingegen 64 %. Bei der Blutentnahme B ist im Virotech-Blot kein positives Pferd zu verzeichnen, im Mikrogen-Blot sind es abermals 64 %. Bei 96 Serumproben der Blutprobe A gibt es 33 übereinstimmende Ergebnisse der beiden Tests. Bei 73 Serumproben der Blutprobe B gibt es lediglich 22 Übereinstimmungen.

Die Gegenüberstellung der Testergebnisse beider Blots der Fohlen liefert ein ähnliches Bild (siehe Kapitel 4.2.1.1.2). Während im Virotech-Blot keine Probe positiv reagiert, werden im Mikrogen-Blot am Tag 33 nach der ersten Blutentnahme 10 % der Pferde als positiv bewertet. Am Tag 70 sind es 33 %, am Tag 104 sind es 30 %, am Tag 131 und 173 je 55 %, am Tag 222 sind es 63 % und am Tag 328 haben 78 % der Fohlen ein positives Resultat. Dem entsprechend gibt es vor allem gegen Ende des Testzeitraums kaum Übereinstimmungen bei den Ergebnissen der beiden Blots. Am Tag 222 stimmen bei 8 Serumproben die Resultate von 3 Proben überein, am Tag 328 gibt es bei 9 Proben lediglich 2 Übereinstimmungen.

Bei der Betrachtung der Bandenmuster der exemplarisch ausgewählten Pferde (siehe Kapitel 4.2.1.2) fällt auf, dass bei den beiden männlichen Pferden des Jahrgangs 2004 und dem Pferd „Shogun“ (Jahrgang 2001) im Virotech-Blot bei beiden Blutentnahmen keine Bande stärker als die Cut-off- Kontrolle befundet wurde und somit als negativ beurteilt wird. Bei Pferd 23208 weisen alle Banden, bis auf die OspC Bande, im Mikrogen-Blot eine starke Intensität auf, so dass das Pferd als positiv bewertet wird. Bei Pferd 25989 erhalten die Banden p100 und VlsE im Mikrogen-Blot die Bewertung „+“,

und das Pferd wird als positiv bezeichnet. Bei dem Pferd „Shogun“ wird im Mikrogen-Blot bei den Blutentnahmen A und B jeweils die Bande p100 mit „+“ und sogar „++“ beurteilt. Das Pferd wird in beiden Fällen als positiv befundet.

Bei dem exemplarisch ausgewählten Fohlen „aus der Atlanta“ werden im Virotech-Blot bei den Blutentnahmen fünf, sieben und acht die VlsE Bande stärker als die Cut-off-Bande bewertet, was laut den Bewertungskriterien den Gesamtbefund „grenzwertig“ zur Folge hat (siehe Kapitel 4.2.1.2). Im Mikrogen-Blot hat die VlsE Bande bereits ab der vierten Blutentnahme eine starke Intensität. Hinzu kommen ab der fünften bis zur achten Blutentnahme noch die Bande p18 und bei der fünften, sechsten und siebten Blutentnahme die Bande p100, so dass das Fohlen ab der fünften Blutentnahme als positiv bezeichnet wird.

Bei dem Fohlen „aus der Givenchy“ wird im Virotech-Blot bei der siebten und achten Blutentnahme nur die 83-kDa-Bande stärker als der Cut-off bewertet. Dem entsprechend werden alle Proben als negativ bezeichnet. Im Mikrogen-Blot hat die VlsE Bande von der dritten bis zur achten Blutentnahme, außer bei der sechsten, eine starke Intensität. Zusätzlich werden bei den Blutentnahmen fünf, sechs und acht die p18-Bande und bei der Blutentnahmen sechs die p100-Bande mit „+“ bewertet, so dass das Fohlen ab der fünften Blutentnahme durchgehend als positiv bezeichnet wird.

Bei dem Fohlen „aus der Sunset“ wird bei der dritten und der siebten Blutentnahme die VlsE Bande stärker als die Cut-off Bande bewertet. Obwohl bei der Blutentnahme sieben die mit „++“ bezeichnete 83-kDa-Bande hinzukommt, werden beide Blutentnahmen als grenzwertig beurteilt; die restlichen Blutentnahmen sind negativ. Im Mikrogen-Blot hat die VlsE Bande bei den Blutentnahmen zwei, drei, vier, sieben und acht eine starke Intensität. Bei den Blutentnahmen zwei, fünf, sechs, sieben und acht wird die p18-Bande als positiv beurteilt, bei den Blutentnahmen zwei, drei, fünf, sechs, sieben und acht die p100-Bande. Bis auf die erste Blutentnahme, bei der keine Bande mit „+“ bewertet wird, und die vierte Blutentnahme, bei der nur die VlsE Bande als positiv beurteilt wird, erhalten alle Blutentnahmen die Bezeichnung positiv.

Für die unterschiedlichen Untersuchungsergebnisse desselben Probenmaterials beim Einsatz der Blots der Firma Virotech und Mikrogen kommen mehrere Ursachen in Frage. Zum einen bestimmt die Cut-off-Kontrolle, wie die einzelnen Banden beurteilt werden. Die Firma Virotech verwendet einen VlsE-Mix Pferd, der im Rahmen der Testevaluierung zu einer hohen Spezifität des Blots führte (Krupka et al., 2012), zur Cut-off-Kontrolle der Firma Mikrogen werden keine Angaben gemacht.

Zum anderen ergeben sich Schwierigkeiten bei der Auswertung von Immunblots, da es kein einheitliches Interpretationsschema gibt, nach dem die einzelnen Banden bewertet werden können. Das Punktbewertungssystem des Mikrogen-Blots sieht jeweils acht Punkte vor, wenn die Banden p100, BmpA und p18 mit „+“ bewertet werden. Ab einem Punktwert von größer/gleich sieben erhält die Probe die Beurteilung positiv.

Bei den Bandenmustern der exemplarisch ausgewählten Pferde fällt bei dem Pferd „Shogun“ auf, dass im Mikrogen-Blot die Bande p100 bei der Blutentnahme A mit „+“ und bei der Blutentnahme B mit „++“ bewertet wurde. Die Bande p100 erhält im Bewertungsschema der Firma Mikrogen acht

Punkte (siehe Kapitel 3.2.2.1.3). Die Auswertekriterien des Virotech-Blots sehen bei Fehlen der VlsE-Bande erst bei zusätzlicher Anwesenheit von vier und mehr Banden einen Hinweis auf Infektion (siehe Kapitel 3.3.2.1). Auch bei dem Fehlen „aus der Givenchy“ würden bei Anlegen der Bewertungskriterien des Virotech-Blots die Blutentnahmen fünf und sieben im Mikrogen-Blot nicht als positiv, sondern als grenzwertig und die Blutentnahme sechs sogar als negativ bezeichnet werden. Bei der fünften Blutentnahme werden die VlsE-Bande und die p18-Bande stärker als der Cut-off bewertet, aber die zusätzliche Bande, die eine positive Beurteilung zur Folge hätte, fehlt. Bei der siebten Blutentnahme ist die VlsE-Bande als positiv vorhanden, jedoch nur eine von drei oder mehr benötigten Banden wird stärker als der Cut-off bewertet. Bei der sechsten Blutentnahme sind nur zwei Banden vorhanden, die VlsE-Bande fehlt. Bei dem Fehlen „aus der Sunset“ würde die Blutentnahme drei statt der Bewertung positiv die Bezeichnung grenzwertig und die Blutentnahmen fünf und sechs würden sogar die Bezeichnung negativ erhalten. Bei der dritten Blutentnahme ist nur die VlsE-Bande als positiv bewertet, und nur eine weitere Bande ist vorhanden. Bei den Blutentnahmen fünf und sechs fehlt die VlsE-Bande, und es weisen nur zwei zusätzliche Banden eine starke Intensität auf. Diese Beispiele zeigen, dass die unterschiedlichen Bewertungskriterien der Banden einen großen Anteil an den unterschiedlichen Testergebnissen beider Blots haben.

In einer Arbeit von Müller und Mitarbeitern, die in Ost-Österreich und Wien durchgeführt wurde, wiesen die Ergebnisse nach Anlegung sechs unterschiedlicher Interpretationskriterien ebenfalls eine große Diskrepanz auf (Müller et al., 2002). In der Studie wurden die Prävalenzen für die Genospezies *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. lusitaniae* und *B. valaisiana* einzeln ermittelt und je nach US-amerikanischen und europäischen Kriterien ausgewertet. Die positiven Immunblot-Ergebnisse betrugen bei Verwendung von USA-Kriterien für *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. lusitaniae* und *B. valaisiana* 66,6 %; 25,1 %; 15,8 %; 0 % bzw. 12,4 % und bei Verwendung von europäischen Kriterien 83,6 %; 93,3 % und 88,4 % (durchgeführt mit *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*) (Müller et al., 2002). Die Ergebnisse zeigen, dass die Interpretation und Auswertung von Blot-Mustern sich als problematisch erweist und sehr unterschiedliche Resultate zur Folge hat. So reagierten z.B. von den 186 Serumpaaren, die jeweils aus den Proben der 1. und 2. Blutentnahme gebildet wurden, im ersten Durchgang 52 % bis 91 % der Proben auf *B. afzelii* positiv, im zweiten Durchgang 53 % bis 93 %.

Auch in der Humanmedizin gestaltet sich die Auswertung von Immunblots schwierig, da es dort gleichfalls an einem einheitlichen Interpretationsschema mangelt (Hauser et al., 1999; Robertson et al., 2000; Wilske et al., 2007; Mavin et al., 2011).

Eine weitere Ursache für abweichende Untersuchungsergebnisse kann in der Verwendung unterschiedlicher Antigene bestehen (Schönert et al. 2004, Ang et al., 2011). Sowohl der Blot der Firma Virotech als auch der Mikrogen-Blot enthalten einheitlich die Antigene von den Genospezies *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* und *B. afzelii*. Der VlsE-Mix der Firma Virotech besteht aus zwei rekombinanten Antigenen der Genospezies *B. burgdorferi* s.s. (B31) und *B. garinii* (IP90). Nach den Angaben der Firma Mikrogen liegt das VlsE als Fusionsprotein vor, das die immundominanten VlsE-Epitope von verschiedenen Genospezies repräsentiert. Der Virotech-Blot enthält einen OspC-Mix, der aus drei rekombinanten Antigenen der Genospezies *B. afzelii* (PKo), *B. bavariensis* (PBi) und *B. burgdorferi* s.s. (ZS7) besteht. Im Mikrogen-Blot werden die OspCs aller drei Genospezies angeboten und darüber hinaus von zwei verschiedenen Stämmen der Genospezies *B. garinii*. Der DbpA-Mix des Virotech-

Blots besteht aus drei rekombinanten Antigenen der Genospezies *B. bavariensis* (PBi) und *B. garinii* (PBr) und dem hochaufgereinigten *B. afzelii* (PKo). Das BmpA (p39) und p83 (p100) enthält bei beiden Blots Antigene von *B. afzelii*. Die Spezifität der Antikörper im Virotech-Blot wird als hochspezifisch (DbpA-Mix, OspC-Mix, BmpA, p83), bzw. spezifisch (VlsE-Mix) angegeben. Die Punktebewertung des Mikrogen-Blots klassifiziert die entsprechenden Banden ähnlich. So erhalten die Antigene p100, BmpA und p18 jeweils acht Punkte, das OspC wird mit sechs Punkten und das VlsE mit vier Punkten bewertet. Beide Blots verwenden rekombinante Antigene, was die Sensitivität gegenüber Lysatblots erhöht und die Standardisierung verbessert (Wilske et al., 2007).

Grundsätzlich besteht auch die Möglichkeit der Kreuzreaktionen mit anderen Spirochäten, die zu einer geringen Spezifität des Tests führen (siehe Kapitel 2.5.2), die aber laut Herstellerangaben bei den hier verwendeten Testsystemen zu vernachlässigen sind. Die Firma Mikrogen weist auf die Verwendung gentechnologisch erzeugter Antigene hin, die in Zusammenarbeit mit dem Nationalen Referenzlabor für Borrelien am Max von Pettenkofer-Institut (jetzt am Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, LGL) entwickelt wurden und den Einfluss von störenden oder kreuzreagierenden Antigenen minimieren sollen.

Ein weiteres Problem ergibt sich durch die Positivkontrolle. Der Blot der Firma Mikrogen ist bis heute kommerziell nicht erhältlich und wurde erstmalig an dem Pferdekollektiv der vorangegangenen Arbeit erprobt. Es wurde keine Positivkontrolle eingesetzt. Beim Virotech-Blot wurde ein hausinternes Kontrollserum des Instituts für Infektionsmedizin und Zoonosen der LMU München verwendet.

Hinzu kommt, dass der Immunblot nicht standardisiert ist und unter verschiedenartigen Rahmenbedingungen durchgeführt wird. Die Auswertung des Tests ist subjektiv und sehr von der Einschätzung des jeweiligen Untersuchers abhängig, was zu starken Schwankungen bei der Beurteilung ihrer Testergebnisse führen kann. In der Vergangenheit wurde schon mehrfach auf die Dringlichkeit einer Evaluierung von indirekten Nachweisverfahren von *B. burgdorferi* s.l. in der Labordiagnostik hingewiesen (Hunfeld et al., 2002; Schönert, 2004).

5.2.2 Gegenüberstellung der Testergebnisse des Virotech-Blots und des Virotech-ELISA

Die Testergebnisse aller untersuchten Pferdeseren zeigen, dass im Virotech ELISA von 222 Proben 195 und im Virotech-Blot 184 Seren negativ beurteilt werden (siehe Kapitel 4.2.2.1). Dies bedeutet, dass 11 Proben nicht bestätigt werden können. Positiv reagieren im ELISA 13 Proben und im Blot 2. Die Bezeichnung grenzwertig erhalten im ELISA 14 Proben und im Blot 36.

Die Gegenüberstellung der Testergebnisse des Virotech-Blots und des Virotech ELISA der gesamten Pferde zeigt, dass es tendenziell mehr Positivreagenten auf Seiten des ELISA gibt (siehe Kapitel 4.2.2.1.1). Bei der Blutentnahme A reagieren im Blot 2 % der Pferde positiv, beim ELISA sind es 7 %. Bei der Blutentnahme B ist im Blot kein positives Pferd zu verzeichnen, im ELISA sind es 6 %. Jedoch werden 19 % der Proben im Blot bei der Blutentnahme A als grenzwertig beurteilt, im ELISA sind es

6 %. Bei der Blutentnahme B werden im Blot 16 % und im ELISA 3 % als grenzwertig beurteilt. Bei 96 Serumproben der Blutprobe A gibt es 72 übereinstimmende Ergebnisse der beiden Tests. Bei 73 Serumproben der Blutprobe B gibt es 58 Übereinstimmungen.

Bei der Gegenüberstellung der Testergebnisse des Blots und des ELISA der Fohlen überwiegen bei beiden Testsystemen die Negativreagenten (siehe Kapitel 4.2.2.1). Während im Virotech-Blot keine Probe positiv reagiert, werden im ELISA am Tag 173 nach der ersten Blutentnahme 18 % der Fohlen als positiv bewertet. In beiden Testsystemen werden bei vier Blutentnahmen Proben als grenzwertig beurteilt. Die Ergebnisse weichen dabei jedoch voneinander ab. So werden im Blot am Tag 70 nach der ersten Blutentnahme 17 % der Proben als grenzwertig bezeichnet; am Tag 131 sind es 18 %, am Tag 222 sind es 38 % und am Tag 328 sind es 22 %. Im ELISA werden am Tag 131 nach der ersten Blutentnahme 9 % der Proben als grenzwertig beurteilt; am Tag 173 sind es ebenfalls 9 %, am Tag 222 sind es 13 % und am Tag 328 sind es 44 %. Bei den Blutentnahmen eins, zwei und vier stimmen die Ergebnisse beider Tests vollkommen überein, bei der dritten Blutentnahme gibt es lediglich eine Abweichung. Bei den Blutentnahmen fünf und sechs stimmen von elf Proben die Ergebnisse von acht überein; bei der Blutentnahme sieben gibt es bei acht Proben sechs Übereinstimmungen und bei der Blutentnahme acht sind es fünf von neun Proben, die übereinstimmen.

Die vergleichende Betrachtung zeigt, dass bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse des Virotech-Blots und des Virotech-ELISA eine wesentlich größere Übereinstimmung vorliegt als bei der Gegenüberstellung des Virotech-Blots und des Mikrogen-Blots. Dennoch gibt es auch hier Abweichungen.

Vielfältige Gründe für divergierende serologische Testergebnisse wurden in einer Arbeit aus der Klinik für Pferde des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin genannt. Schönert untersuchte im Rahmen ihrer Dissertation Patientenproben mittels dreier verschiedener ELISA-Testsysteme, basierend auf europäischen Isolaten von *B. afzelii* (ELISA A), *B. burgdorferi* s.s. (ELISA B) und *B. garinii* (Stamm 1B29) (ELISA C) sowie einem IFAT basierend auf *B. garinii* (Stamm 1B29) (siehe Kapitel 2.4.3.2). Ein Teil der Seren wurde ferner mittels Immunblot sowie mittels eines weiteren ELISA untersucht. Die Ergebnisse der serologischen Tests ließen eine hohe Diskrepanz innerhalb der Seroreagenten erkennen. Schönert diskutierte als mögliche Gründe für diese Abweichungen den Einsatz unterschiedlicher Antigene, die Anwendung nicht einheitlicher Verdünnungsmodalitäten und das Fehlen definierter Positivkontrollen. Außerdem wurde die nicht standardisierte Festlegung des Cut-off (ELISA) und des Grenztiters beim IFAT kritisch bewertet (Schönert, 2004).

Stefancikova und Mitarbeiter untersuchten Pferdeseren auf Antikörper (IgG) gegen *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* und *B. garinii* mittels ELISA (siehe Kapitel 2.4.3.2.). Ein Teil der gesammelten Proben wurde einem differenzierten ELISA-Test unterzogen. In einem Test wurde *B. garinii* als Antigen verwendet; ein Test basierte auf einer Kombination aus *B. burgdorferi* s.s. und *B. afzelii*, ein weiterer Test auf *B. afzelii*. Die Ergebnisse dieser Tests fielen unterschiedlich aus, *B. afzelii* wurde als dominante Genospezies ermittelt. Von den ELISA-positiven Proben wurde ein Teil anschließend mit einem Immunblot, basierend auf *B. burgdorferi* s.s. und *B. afzelii* untersucht, wobei 60 % der positiven Resultate bestätigt wurden. Die Autoren sahen das Hauptproblem der abweichenden Testergebnisse in der Heterogenität von *B. burgdorferi* s.s. und damit in der Verwendung der verschiedenen Antigene in den Testsystemen (Stefancikova et al., 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde der ELISA der Firma Virotech verwendet, der den Nachweis gegen *B. burgdorferi* s.s. erbringen kann, während der Virotech-Blot die Genospezies *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* und *B. afzelii* als Antigen enthält.

Ein weiteres, wie schon in der Studie von Schönert diskutiertes Problem (Schönert, 2004), besteht in der unterschiedlichen Festlegung des Schwellenwertes (Cut-off). Für die Berechnung und Bewertung der Testergebnisse im ELISA gibt es bis heute keine einheitliche Regelung. So wird der Cut-off von den Herstellerfirmen selbst festgelegt. Die Testresultate werden in firmenindividuellen Einheiten angegeben, die herstellerdefinierten Negativ-, Grenz- und Positivbereichen zugeordnet sind.

Die Möglichkeit von Kreuzreaktionen können auch laut Virotech vernachlässigt werden. Die Firma bezieht sich dabei auf eine Untersuchung Leptospiren-positiver Pferdeseren, bei der keine Kreuzreaktivität zum *B. burgdorferi* Veterinär ELISA festgestellt wurde. Die Spezifität des ELISA V wird laut Gebrauchsinformation mit 96 % und die Sensitivität mit 100 % angegeben, mit der Einschränkung, dass dieser Wert statistisch unsicher sei, da nur 3 positive Borrelien IgG Seren für die Testungen zur Verfügung standen.

Einen weiteren Unsicherheitsfaktor stellt auch hier die Positivkontrolle aufgrund ihrer mangelnden Definition dar: Die Firma Virotech verwendet in ihrem ELISA als Positivkontrolle Serumproben von Pferden, die mit selbigem Testsystem in der Vergangenheit positiv bewertet wurden. Im Rahmen ihrer Dissertation testete Schönert die Positivkontrollen der beiden kommerziell erhältlichen ELISA, die bei ihren Untersuchungen eingesetzt wurden, mit Hilfe des Western-Blots. Bei einem der beiden handelte es sich um den ELISA der Firma Virotech. Beide Positivkontrollen konnten nicht bestätigt werden. Das bedeutet, dass beide ELISA keine definierte Positivkontrolle besitzen. Laut Schönert stellt das Fehlen einer definierten Positivkontrolle die Aussagefähigkeit hinsichtlich Spezifität und Sensitivität des ELISA in Frage und muss als mögliche Ursache der Diskrepanz der ELISA-Ergebnisse angesehen werden (Schönert, 2004).

5.2.3 Bewertung der diagnostischen Eignung der serologischen Testsysteme zum Nachweis von Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi* beim Pferd

Die gegenwärtige Empfehlung zur serologischen Diagnostik der Lyme-Borreliose sieht sowohl in der Human- als auch der Tiermedizin das Prinzip des Zweistufentests vor (Wilske et al., 2007; Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, 2008; Robert-Koch-Institut, 2013). Als erste Stufe wird der ELISA als Suchtest empfohlen, der Immunblot wird in der zweiten Stufe als Bestätigungstest eingesetzt. Eine hohe Spezifität von mindestens 95 % ist dabei Voraussetzung (Wilske et al., 2007).

Die Gegenüberstellung der Blots der Firma Virotech und der Firma Mikrogen zeigt eine deutliche Mehrheit an positiven Pferdeseren auf Seiten des Mikrogen-Blots (siehe Kapitel 4.2.1). Selbst unter der Berücksichtigung, dass laut Literatur die meisten Fälle einer equinen Borrelieninfektion inapparent verlaufen (Käsbohrer et al., 1990; Cohen et al., 1992; Tasai et al., 1993; Gerhards et al., 1996; Salinas-Meléndez et al., 2001; Müller et al., 2002; Schönert 2004; Stefancikova et al., 2008) ist es

unrealistisch, dass in einem Pferdebestand, in dem während des Zeitraums der Blutentnahmen bei keinem Pferd klinische Anzeichen einer Lyme-Borreliose auftraten, eine derart hohe Zahl an Positiv-reagenten zu verzeichnen ist. Vor allem die Testergebnisse der Fohlen lassen große Zweifel an der Zuverlässigkeit des Mikrogen-Blots aufkommen. Obwohl die Fohlen erst ungefähr ab dem ersten Blutentnahmetermin Weidegang und somit potentiellen Zeckenkontakt hatten (siehe Kapitel 3.2.1.1), erhöht sich die Zahl der im Mikrogen-Blot positiv untersuchten Fohlenserum sukzessiv, während im Virotech-Blot innerhalb des gesamten Testzeitraums kein Fohlen positiv befundet wurde. Sowohl bei den Fohlen als auch bei den älteren Pferden konnte bei keinem Blutentnahmetermin ein Zeckenbefall beobachtet werden. Die mittels PCR geschätzte Prävalenz von *B. burgdorferi* in adulten Zecken des Gestütsgebietes betrug 18 % (siehe Kapitel 4.3). Laut dem Robert-Koch Institut wird die deutschlandweite Prävalenz des Erregers in adulten Zecken auf 20 % geschätzt (siehe Kapitel 2.4.1). Der Vergleich zeigt, dass die Pferde des Gestüts Schwaiganger keinem erhöhten Infektionsrisiko ausgesetzt waren.

Die vergleichende Betrachtung der Bandenmuster offenbart zum einen, dass eine Überzahl an Banden im Mikrogen-Blot als positiv beurteilt wird (siehe Kapitel 4.2.1.2). Da im Virotech-Blot dieselbe Bande oftmals die Bewertung negativ erhält, muss die Auswertung und insbesondere die Cut-off-Kontrolle des Mikrogen-Blots mit Skepsis betrachtet werden. Zum anderen liefert das Auswertungsschema des Mikrogen-Blots übermäßig viele positive Gesamtergebnisse, die nicht der Wirklichkeit entsprechen können.

Abschließend sind die Resultate des RecomBlot Borrelia IgG der Firma Mikrogen als unzuverlässig zu bewerten. Für den Nachweis einer Borrelieninfektion beim Pferd ist der Test nicht geeignet und sollte in der serologischen Diagnostik auch zukünftig keinen Einsatz finden.

Um die Leistungsdaten des Blots der Firma Virotech zu erheben, wurde im Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen des Veterinärwissenschaftlichen Departments der LMU München eine Vergleichstestung zum Zweistufentest an 149 definierten Pferdeseren durchgeführt (siehe Kapitel 3.3.2.1). Die Testauswertung zeigt, dass mit dem Immunblot der Firma Virotech mehr equine Seren als klar negativ eingestuft werden können, die vorher zumeist als positiv/grenzwertig befundet wurden. Dies entspricht auch eher der diagnostischen Realität. Sowohl die Ergebnisse dieser Evaluierung als auch die Resultate der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der *Borrelia* Veterinär plus OspA Line IgG Line Immunoblot der Firma Sekisui Virotech sich als wertvolles Diagnostikum zum Nachweis spezifischer Antikörper gegen *B. burgdorferi* s.l. erweist und im Zweistufentest zur Bestätigung reaktiver Seren eingesetzt werden kann.

Der in der ersten Stufe des Zweistufentests eingesetzte ELISA soll vorwiegend der Erkennung negativer Seren dienen, deren Untersuchung damit abgeschlossen ist. In der vorliegenden Arbeit wurden von 222 Pferdeseren im Virotech ELISA 195 Proben negativ untersucht, von denen 11 im Virotech-Blot nicht bestätigt werden konnten. Demgegenüber stehen 36 grenzwertig und nur 2 positiv befundene Proben auf Seiten des Virotech-Blots. Im Zweistufentest sollte der ELISA immer mehr Seren positiv bewerten als der Immunblot, da dieser nur die positiven Seren bestätigt. In der empfohlenen Kombination des Zweistufentests kann der *Borrelia burgdorferi* Veterinär ELISA der Firma Virotech

somit als sinnvolles Diagnostikinstrument angesehen werden, mit dessen Hilfe im ersten Schritt ein Screening durchgeführt werden kann, um Negativreagenten zu erkennen.

5.2.4 Schlussfolgerungen

Aufgrund der divergierenden Ergebnisse der vorangegangenen Studie und der Vergleichstestung der vorliegenden Arbeit ist eine Evaluierung und Standardisierung der in der Diagnostik eingesetzten indirekten serologischen Testmethoden zum Erregernachweis der Lyme-Borreliose zwingend erforderlich.

Die diagnostische Eignung des *Borrelia* Veterinär plus OspA Line IgG Line Immunoblot der Firma Sekisui Virotech im empfohlenen Zweistufentest zur Charakterisierung reaktiver Seren konnte bestätigt werden. Ebenso kann der *Borrelia burgdorferi* Veterinär ELISA der Firma Virotech im ersten Diagnostikschritt zur Erkennung negativer Seren eingesetzt werden. Grundsätzlich sollte bei der Interpretation der serologischen Ergebnisse immer das klinische Bild und eventuell weitere zur Verfügung stehende Laborbefunde mit einbezogen werden, da falsch negative Ergebnisse, vor allem im Screening mittels des ELISA, nicht ausgeschlossen werden können.

6 Zusammenfassung

Es ist bekannt, dass Weidepferde in Endemiegebieten einem hohen Infektionsrisiko mit *Borrelia burgdorferi* sensu lato ausgesetzt sind. Obwohl die meisten Fälle einer equinen Borrelieninfektion offenbar inapparent verlaufen, gibt es zahlreiche Fallbeschreibungen von mit Borrelieninfektionen assoziierten Erkrankungen beim Pferd mit direktem Nachweis von *B. burgdorferi* s.l. Das in der Literatur beschriebene klinische Bild ist vielfältig, und es lässt sich kein einheitliches Krankheitsbild beim Pferd definieren. Umso wichtiger ist bei der Verdachtsdiagnose Lyme-Borreliose ein zuverlässiger serologischer Erregernachweis. Aufgrund der bis heute mangelnden Standardisierung der Untersuchungsmethoden ergeben sich gerade hier jedoch große Schwierigkeiten.

Das übergeordnete Ziel der vorliegenden Dissertation war die Überprüfung der diagnostischen Eignung von einem Immunblot der Firma Mikrogen und einem ELISA der Firma Virotech, die in einer durchgeführten vorausgegangenen Arbeit Einsatz fanden und widersprüchliche Ergebnisse lieferten. Da die gegenwärtige Empfehlung zur serologischen Diagnostik der Lyme-Borreliose das Prinzip des Zweistufentests vorsieht, wurden diese beiden Untersuchungssysteme ausgewählt. Zu diesem Zweck wurde eine Subgruppe, deren Blutproben bereits 2007 mit diesen beiden Testsystemen untersucht wurden, erneut mittels eines weiteren Immunblots, ebenfalls der Firma Virotech, untersucht. Um eine Aussage über die diagnostische Wertigkeit treffen zu können, wurden die Ergebnisse gegenübergestellt und miteinander verglichen.

Die analysierten Blutproben stammten von Pferden des Bayerischen Haupt- und Landgestüts Schwaiganger und wurden im Zeitraum von Juli 2005 bis Juni 2006 in vier- bis sechswöchigen Abständen entnommen. Die mittels PCR geschätzte Prävalenz von *Borrelia burgdorferi* in den Zecken des Gestütsgebietes betrug 18 %.

Für die Subgruppe wurden die Proben der fünften und sechsten Blutentnahme der vorausgegangenen Arbeit ausgewählt, da zu diesen Terminen die meisten Proben im Immunblot und übereinstimmend im ELISA V untersucht wurden. Von der fünften Blutentnahme, im Folgenden als Blutentnahme A bezeichnet, wurden 96 Proben im Jahr 2015 erneut untersucht. Von der sechsten Blutentnahme, im Folgenden als Blutentnahme B bezeichnet, wurden 73 Proben für die erneute Untersuchung ausgewählt. Sämtliche Jahrgänge der damals untersuchten Pferde wurden in die Subgruppe einbezogen. Aus der Gruppe der Fohlen wurden 11 Tiere ausgewählt. Aufgrund dieser geringen Anzahl der Tiere konnten die Proben aller acht stattgefundenen Blutentnahmen untersucht werden.

Die Gegenüberstellung der Testergebnisse des Virotech-Blots und des Mikrogen-Blots der gesamten Pferde zeigte auf den ersten Blick, dass im Mikrogen-Blot eine deutliche Mehrheit der Proben positiv bewertet wurde. Bei der Blutentnahme A reagierten im Virotech-Blot dagegen nur 2 % der Pferde positiv, beim Mikrogen-Blot waren es hingegen 64 %. Bei der Blutentnahme B war im Virotech-Blot kein positives Pferd zu verzeichnen, im Mikrogen-Blot waren es abermals 64 %. Bei 96 Serumproben der Blutprobe A gab es 33 übereinstimmende Ergebnisse der beiden Tests. Bei 73 Serumproben der Blutprobe B gab es lediglich 22 Übereinstimmungen.

Die Gegenüberstellung der Testergebnisse beider Blots mit Seren der Fohlen lieferte ein ähnliches Bild. Während im Virotech-Blot keine Probe positiv reagierte, wurden im Mikrogen-Blot zwischen Tag 33 und Tag 328 nach der ersten Blutentnahme minimal 10 % bis maximal 78 % der Pferde positiv untersucht. Dem entsprechend gab es kaum Übereinstimmungen zwischen den Ergebnissen der beiden Blots.

Die vergleichende Betrachtung der Bandenmuster der drei exemplarisch ausgewählten Pferde zeigte, dass es auf Seiten des Virotech-Blots keine positiv bewertete Bande gab, während auf Seiten des

Mikrogen-Blots diverse Banden positiv befundet wurden und alle Teststreifen das Gesamturteil „positiv“ erhielten. Bei den drei exemplarisch ausgewählten Fohlen war im Virotech-Blot ebenfalls kein Teststreifen mit dem Gesamturteil „positiv“ zu verzeichnen. Von den 44 ausgewerteten Teststreifen wurden im Virotech-Blot lediglich fünf als grenzwertig beurteilt. Im Mikrogen-Blot gab es vier Teststreifen mit dem Gesamturteil „grenzwertig“ und 14 Teststreifen wurden als positiv befundet.

Die Gegenüberstellung der Testergebnisse des Virotech-Blots und des Virotech-ELISA der gesamten Pferde, inklusive der Fohlen, zeigte, dass im Virotech-ELISA von 222 Proben 195 und im Virotech-Blot 184 Seren negativ beurteilt wurden. Dies bedeutet, dass 11 Proben nicht bestätigt werden konnten. Positiv reagierten im ELISA 13 Proben und im Blot 2. Die Bezeichnung „grenzwertig“ erhielten im ELISA 14 Proben und im Blot 36.

Die vergleichende Betrachtung ergab, dass bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse des Virotech-Blots und des Virotech-ELISA eine wesentlich größere Übereinstimmung vorlag als bei der Gegenüberstellung des Virotech-Blots und des Mikrogen-Blots.

Die Resultate des RecomBlot *Borrelia* IgG der Firma Mikrogen sind als unzuverlässig zu bewerten. Die übermäßig vielen positiv befundenen Proben weichen von der diagnostischen Realität ab.

Aufgrund der Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit konnte die diagnostische Eignung des *Borrelia* Veterinär plus OspA Line IgG Line Immunoblot und des *Borrelia burgdorferi* Veterinär ELISA der Firma Sekisui Virotech bestätigt werden. In der empfohlenen Kombination des Zweistufentests erweisen sich beide Untersuchungssysteme als verwendbare Diagnostikinstrumente zum Nachweis einer Borrelieninfektion.

7 Summary

It is widely known that horses mainly living on meadows in endemic regions are exposed to a high infection risk with *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Although most cases of equine borrelia infection seem to proceed inapparent, there are numerous reports of cases of borrelia-infection associated illnesses in horses with direct confirmation of *B. burgdorferi* sensu lato. The clinical signs described in literature are versatile and there is no homogeneous disease pattern defined for horses. The more important it is to have a reliable serological verification of pathogenic agents as soon as there is the suspicion of Lyme disease. Huge problems result of the still deficient standardisation of examination methods.

The superior target of this dissertation was the revision of the diagnostic suitability of an immunoblot of Mikrogen and an ELISA of Virotech, both of which had been used in a preliminary paper and provided contradictory results. As the current recommendation of serological clinical diagnostics of Lyme disease allots a two-step test, both examination systems mentioned above were chosen. For this purpose, a subgroup, whose blood samples had already been tested with those systems in 2007, was again tested with another immunoblot of Virotech. In order to be able to make a declaration concerning the diagnostic value the results were confronted and compared.

The analysed blood samples came from horses of the Bavarian “Haupt- und Landgestüt Schwaiganger” and were taken in the period between July 2005 to June 2006 in intervals of four to six weeks. The via PCR estimated prevalence of *Borrelia burgdorferi* in the ticks of the stud’s grounds amounted to 18 %.

The samples of the fifth and sixth blood withdrawal of the preliminary paper were chosen for the subgroup as most samples had been tested concordantly with immunoblot as well as ELISA V at these dates. 96 samples of the fifth blood withdrawal, subsequently to be referred to as blood withdrawal A were again tested in 2015. 73 samples of the sixth blood withdrawal, subsequently to be referred to as blood withdrawal B, were chosen from another testing. All age groups of the formerly tested horses were included in the subgroup. 11 foals were chosen. Due to the small number of animals the samples of all eight blood withdrawals could be tested.

At first sight, the comparison of the results of the Virotech-blot and the Mikrogen-blot of all horses showed that a distinct majority of the samples of the Mikrogen-blot could be rated as positive. In the blood withdrawal A only 2 % of the horses reacted positively on the Virotech-blot, compared to 64 % on the Mikrogen-blot. In the blood withdrawal B there was no positive horse to be listed on the Virotech-blot whereas there were again 64 % on the Mikrogen-blot. Out of 96 samples of blood withdrawal A there were 33 correlating results of both tests. Out of 73 samples of blood withdrawal B there were only 22 conformities.

The comparison of the results of both blots with sera of the foals provided a similar pattern. While no sample reacted positively on the Virotech-blot, 10 % to 78 % of the tested horses were tested positively on the Mikrogen blot between the 33rd and 328th day after the first withdrawal. Accordingly, there were only few matches of the two blots.

The comparing examination of the banding pattern of three exemplarily chosen horses showed that there were no positively rated bands on the part of the Virotech-blot whereas there were various bands to be positively rated on the part of the Mikrogen-blot whose control strips all received the attribute “positive”.

Concerning the three exemplarily chosen foals there again was no control strip rated “positive” on the Virotech-blot. Only five of 44 evaluated control strips of the Virotech-blot were rated as “marginal”. Compared to Virotech, four control strips were rated as “marginal” and fourteen as “positive” on the Mikrotech-blot.

The comparison of the results of the Virotech-blot and Virotech-ELISA of all horses, including the foals, showed that on Virotech-ELISA 195 out of 222 samples and on the Virotech-blot 184 samples were rated negatively which means that 11 samples could not be confirmed. 13 samples reacted positively on ELISA, two on the blot. The label “marginal” was given to 14 ELISA samples and 36 of the blot.

The comparing observation revealed a larger consensus between the results of Virotech-blot and Virotech-Elisa than between Virotech-blot and Mikrogen-blot.

The results of the ReclomBlot *Borrelia* IgG of Mikrogen can be rated as unreliable. The excessive amount of positively adjudged samples aberrates from the diagnostic reality.

Due to the results of this work the diagnostic suitability of the *Borrelia Veterinär plus OspA Line IgG Line Immunoblot* and the *Borrelia burgdorferi Veterinär ELISA* of Sekisui Virotech could be confirmed. Both testing systems approve as suitable diagnostic instruments to proof Lyme disease in the recommended two-step test.

8 Literaturverzeichnis

Afzelius, A., 1910. Verhandlungen der dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm. Arch. Derm. Syph. 101, 404.

Altman, D.G., 1991. Practical statistics for medical research. Chapman& Hall.

Anderson, J.F., 1988. Mammalian and avian reservoirs for *Borrelia burgdorferi*. Ann. N.Y. Acad. Sci., 539, 180-188.

Ang, C.W., Notermans, D.W., Hommes M., Simoons-Smit, A.M., Herremans, T., 2011. Large differences between test strategies for the detection of anti-Borrelia antibodies are revealed by comparing eight ELISAs and five immunoblots. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 30, 1027-1032.

Bärfverstedt, B., 1943. Über *Lymphadenosis benigna cutis*. Acta Derm. Venereol. Suppl. (Stockh.) 11, (Suppl. zu 24) 1-202.

Balmelli, T., Piffaretti, J.C., 1995. Association between different clinical manifestations of Lyme disease and different species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Res. Microbiol. 146, 329-340.

Baranton, G., Postic, D., Saint, G., Boerlin, I. P., Piffaretti, J. C., Assous, M., Grimont, P. A., 1992. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., group VS461 associated with Lyme borreliosis. Int. J. Syst. Bacteriol. 42, 378-383.

Barbour, A. G., 1984. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. Yale J. Biol. Med. 57, 521-525.

Barbour, A.G., Hayes, S.F., 1986. Biology of *Borrelia* species. Microbiol. Rev. 50, 381-400.

Berg, D., Abson, K.G., Prose, N.S., 1991. The laboratory diagnosis of Lyme disease. Arch. Dermatol. 127, 866-870.

Berger, B.W., Johnson, R.C., Kodner, C., Coleman, L., 1992. Cultivation of *Borrelia burgdorferi* from *erythema migrans* lesions and perilesional skin. J. Clin. Microbiol. 30 (2), 359-361.

Bhide, M., Yilmaz, Z., Golcu, E., Torun, S., Mikula, I., 2008. Seroprevalence of anti-*Borrelia burgdorferi* antibodies in dogs and horses in Turkey. Ann. Agric. Environ. Med. 15, 85-90.

Bissett, M.L., Hill, W., 1987. Characterization of *Borrelia burgdorferi* strains isolated from *Ixodes pacificus* ticks in California. J. Clin. Microbiol. 25 (12), 2296-2301.

Brisson, D., Dykhuizen, D.E., 2004. OspC diversity in *Borrelia burgdorferi*: different hosts are different niches. Genetics 168, 713-722.

Browning, A., Carter, S.D., Barnes, A., May, C., Bennett, D., 1993. Lameness associated with *Borrelia burgdorferi* infection in the horse. Vet. Rec. 132, 610-611.

Bruckbauer, H. R., Preac-Mursic, V., Fuchs, R., Wilske, B. 1992. Cross-reactive proteins of *Borrelia burgdorferi*. Europ. J. Clin. Microbiol. & Inf. Diseases 11 (3), 224-232.

Buchwald, A., 1883. Ein Fall von diffuser idiopathischer Haut-Atrophie. Arch. Dermatol. Syph. (Berlin) 10, 553-556.

Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Hayes, S.F., Benach, J.L., Grunwaldt, E., Davis, J.P., 1982. Lyme disease-a tick-borne spirochetosis? Science 216, 1317-1319.

Burgdorfer, W., 1984. Discovery of the Lyme disease spirochete and its relation to tick vectors. Yale J. Biol. Med. 57, 515-520.

Burgdorfer, W., Hayes, S.F., Corwin, D., 1989. Pathophysiology of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in ixodid ticks. Rev. Infect. Dis. 11 Suppl. 6, 1442-1450.

Burgess, E.C., Gillette, D., Pickett, J.P., 1986. Arthritis and panuveitis as manifestations of *Borrelia burgdorferi* infection in a Wisconsin pony. J. Am. Vet. Med. Assoc., 189 (10), 1340-1342.

Burgess, E.C., Mattison, M., 1987. Encephalitis associated with *Borrelia burgdorferi* infection in a horse. J. Am. Vet. Med. Assoc. 191 (11), 1457-1458.

Burgess, E.C., 1988. *Borrelia burgdorferi* Infection in Wisconsin Horses and Cows. Ann. N.Y. Acad. Sci. 539, 235-243.

Burgess, E.C., Gendron-Fitzpatrick, A., 1990. Experimental infection of equines with *Borrelia burgdorferi*. IV. International Conf. on Lyme Borreliosis, Stockholm 1990, Abstract A, 38

Burgess, E.C., Gendron-Fitzpatrick, A., Mattison, M., 1990. Foal mortality associated with natural infection of pregnant mares with *Borrelia burgdorferi*. Equ. Inf. Diseases V. (Proc. 5th Intern. Disease Conf.) Powell, D.G. (Ed). Univ. Press of Kentucky. 217-220.

Bykowski, T., Babb, K., von Lackum, K., Riley, S.P., Norris, S.J., Stevenson, B., 2006. Transcriptional Regulation of the *Borrelia burgdorferi* Antigenically Variable VlsE Surface Protein. J. Bacteriol. 188 (13), 4879-4889.

Canica, M.M., Nato, F., du Merle, L., Mazie, J.C., Baranton, G., Postic, D., 1993. Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. Associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. Scand. J. Infect. Dis. 25, 441-448.

Carter, S.D., May, C., Barnes, A., Bennett, D., 1994. *Borrelia burgdorferi* infection in UK horses. Equine Vet. J. 26 (3), 187-190.

Casjens, S.R., Fraser-Liggett, C.M., Mongodin, E.F., Qiu, W.G., Dunn, J.J., Luft, B.J., Schutzer, S.E., 2011. Whole genome sequence of an unusual *Borrelia burgdorferi* s.l. isolate. J. Bacteriol. 193 (6), 1489-1490.

Chang, Y.-F., Novosol, V., McDonough, S.P., Chang, Ch.-F., Jacobson, R.H., Divers, T., Quimby, F.W., Shin, S., Lein, D.H., 2000. Vaccination against Lyme Disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface protein A (rOspA) in horses. Vaccine 18, 540-548.

Christen, H., 1987. Die Lyme-Borreliose: Ätiopathologie und Klinik. Hyg. Med. 12, 352-356.

- Christen, H.J., Hanefeld, F., Eiffert, H., Thomssen, R., 1993. Epidemiology and clinical manifestations of Lyme Borreliosis in childhood. A prospective multicenter study with special regard to neuroborreliosis. Acta. Paediatr. Suppl. 386, 1-76.
- Chu, C.Y., Liu, W., Jiang, B.G., Wang, D.M., Jiang, W.J., Zhao, Q.M., Zhang, P.H., Wang, Z.X., Tang, G.P., Yang, H., Cao, W.C., 2008. Novel genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from rodents and ticks in southwestern China. J. Clin. Microbiol. 46 (9), 3130-3133.
- Coburn, J., Leong, J.M., Erban, J.K., 1993. Integrin alpha IIb beta 3 mediates binding of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* to human platelets. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (15), 7059-7063.
- Cohen, D., Bosler, E.M., Bernard, W., Meirs II., D., Eisner, R., Schulze, T.L., 1988. Epidemiologic studies of Lyme disease in horses and their public health significance. Ann. N.Y. Acad. Sci. 539, 244-257.
- Cohen, N.D., Heck, C., Heim, B., Flad, D.M., Bosler, E.M., Cohen, D., 1992. Seroprevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in a population of horses in central Texas. JAVMA 201 (7), 1030-1033.
- Comstock, L.E., Thomas, D.D., 1991. Characterization of *Borrelia burgdorferi* invasion of cultured endothelial cells. Micro.Patho. 10 (2), 137-148.
- Coons, A.H., Creech, H.J., Jones, R.N., 1941. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 47, 200-202.
- Coyle, P., 1993. Lyme disease. Mosby year book, St.Louis 235 pp.
- Craft, J.E., Grodzicki, R.L., Steere, A.C., 1984. Antibody response in Lyme disease: evaluation of diagnostic tests. J. Infect. Dis. 149, 789-795.
- Dattwayler, R.J., Luft, B.J., 1989. Immundiagnosis of Lyme Borreliosis. Rheum. Dis. Clin. N.A. 15 (4), 11.
- Dejmkova, H., Hulinska, D., Tegzova, D., Pavelka, K., Gatterova, J., Vavrik, P., 2002. Seronegative Lyme Arthritis durch *Borrelia garinii*. Clin.Rheumatol. 21 (4), 330-334.
- Divers, T.J., Chang, Y.F., McDonough, P.L., 2003. Equine Lyme Disease: A Review of Experimental Disease Production, Treatment Efficacy, and Vaccine Protection. In: 49th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, 2003, New Orleans, Louisiana (Ed.)
- Divers, T.J., 2103. Equine Lyme Disease. J. Equ. Vet. Sci. 33, 488-492.
- Dorward, D.W., Fischer, E.R., Brooks, D.M., 1997. Invasion and cytopathic killing of human lymphocytes by spirochetes causing Lyme disease.Clin. Infect. Dis. 1997 Jul; 25 Suppl 1: S2-8
- Durrani, A.Z., Goyal, S.M., 2011. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* in horses in Minnesota. J. Anim. Plant Sci. 21 (1), 8-11.
- Dzierzecka, M., Kita, J., 2002. The use of chosen serological diagnostic methods in Lyme disease in horses. Part II. Western blot. Pol. J. Vet. Sci. 5 (2), 79-84.
- Eckert, J., Friedhoff, K.T., Zahner, H., Deplazes, P., 2008. Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. 2. Aufl. Edition. Enke Verlag in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH und Co. KG, Stuttgart.

- Egenvall, A., Franzén, P., Gunnarsson, A., Olsson Engvall, E., Vågsholm, I., Wikström, U.B., Artursson, K., 2001. Cross-sectional study of the seroprevalence to *Borrelia burgdorferi* sensu lato and granulocytic *Ehrlichia* spp. And demographic, clinical and tick-exposure factors in Swedish horses. *Prev. Vet. Med.* 49, 191-208.
- Eisner, R.J., Meirs, D.A., Meirs III., D.A., Ralston, S.L., 1994. Lack of correlation between exposure to Lyme Disease (*Borrelia burgdorferi*) and pregnancy loss in mares. *J. Equ. Vet. Sci.* 14 (2), 102-105.
- Embers, M.E., Ramamoorthy, R., Philipp, M.T., 2004. Survival strategies of *Borrelia burgdorferi*, the etiologic agent of Lyme disease. *Microbes and Infect.* 6, 312-318.
- Fingerle, V., Hauser, U., Liegl, G., Petko, B., Preac-Mursic, V., Wilske, B., 1995. Expression of outer surface protein A and C of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*. *J. Clin Microbiol.* 33, 1867-1869.
- Fingerle, V., Rauser, S., Hammer, B., Kahl, O., Heimerl, C., Schulte-Spechtel, U., Gern, L., Wilske, B., 2002. Dynamics of dissemination and outer surface protein expression of different European *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains in artificially infected *Ixodes ricinus* nymphs. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1456-1463.
- Fingerle, V., Schulte-Spechtel, U.C., Ruzic-Sabljic, E., Leonhard, S., Hofmann, H., Weber, K., Pfister, K., Strle, F., Wilske, B., 2008. Epidemiological aspects and molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* s.l. from southern Germany with special respect to the new species *Borrelia spielmanii* sp. nov.. *Int. J. Med. Microbiol.* 298 (3-4), 279-290.
- Fingerle, V., 2008. Epidemiologie der Lyme-Borreliose, Nationales Referenzzentrum Borrelien, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit.
- Fingerle, V., 2015. Die neuen mikrobiologisch-infektiologischen Qualitätsstandards zur Lyme Borreliose (MiQ12). (Kongressbeitrag) *Gesundheitswesen* 2015; 77 - A36, DOI: 10.1055/s-0035-1562992.
- Fischer, J.R., Parveen, N., Magoun, L., Leong, J.M., 2003. Decorin-binding proteins A and B confer distinct mammalian cell type-specific attachment by *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete. *PNAS* 35, 490-518.
- Fraser, C.M., Casjens, S., Huang, W.M., Sutton, G.G., Clayton, R., Lathigra, R., White, O., Ketchum, K.A., Dodson, R., Hickey, E.K., Gwinn, M., Dougherty, B., Tomb, J.F., Fleischmann, R.D., Richardson, D., Peterson, J., Kerlavage, A.R., Quackenbush, J., Salzberg, S., Hanson, M., van Vugt, R., Palmer, N., Adams, M.D., Gocayne, J., Weidman, J., Utterback, T., Watthey, L., McDonald, L., Artiach, P., Bowman, C., Garland, S., Fuji, C., Cotton, M.D., Horst, K., Roberts, K., Hatch, B., Smith, H.O., Venter, J.C., 1997. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature.* 390 (6660), 553-555.
- Frey, A.B., Rao, T.D., 1995. Single exposure of mice to *Borrelia burgdorferi* elicits immunoglobulin G antibodies characteristic of secondary immune response without production of interleukin-4 by immun T cells. *Infect. Immun.* 63 (7), 2596-2603.
- Fukunaga, M., Hamase, A., Okada, K., Nakao, M., 1996 a. *Borrelia tanukii* sp nov and *Borrelia turdae* sp nov found from ixodid ticks in Japan: rapid species identification by 16S rRNA genetargeted PCR analysis. *Microbiol. Immunol.* 40, 877-81.

Fukunaga, M., Okada, K., Nakao, M., Konishi, T., Sato, Y., 1996 b. Phylogenetic Analysis of *Borrelia* Species Based on Flagellin Gene Sequences and Its Application for Molecular Typing of Lyme Disease Borreliae. Int. J. Syst. Bacteriol. 46 (4), 898-905.

Gerhards, H., Wollanke, B., 1996. Antikörpertiter gegen Borrelien bei Pferden im Serum und im Auge und Vorkommen der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU). Berl. Münch. Wschr. 109, 273-278.

Gern, L., Estrada-Pena, A., Frandsen, F., Gray, J.S., Jaenson, T.G.T., Jøgejan, F., Kahl, O., Korenberg, E., Mehl, R., Nuttall, P.A., 1998. Review: European reservoir hosts of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Zbl. Bakteriologie, 287, 196-204.

Girschick, H.J., Huppertz, H.I., Russmann, H., Krenn, V., Karch, H., 1996. Intracellular persistence of *Borrelia burgdorferi* in human synovial cells. Rheumatol. Int. 16, 125-132.

Grabner, A., Gall, Y., Palm, K., Schönert, S., Pfister, K., 2008. Lyme-Borreliose bei einem Pony mit Meningitis? – Vergleichende Diagnostik. Leipz. Bl. Hefte 53-57.

Gray, J.S., Kirstein, F., Robertson, J.N., Stein, J., Kahl, O., 1999. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks and rodents in a recreational park in south-western Ireland. Exp. Appl. Acarol. 23, 717-729.

Greene, C.E., Appel, M.J., Straubinger, R.K., 1998. Lyme borreliosis. In: Infectious diseases of the dog and cat, 2nd edition, (C.E. Greene) W.B. Saunders Company; Philadelphia S. 282-293.

Hahn, C.N., Mayhew, I.G., Whitwell, K.E., Smith, K.C., Carey, D., Carter, S.D., Read, R.A., 1996. A possible case of Lyme borreliosis in a horse in the UK. Equ. Vet. J. 28 (1), 84-88.

Hanincova, K., Schafer, S.M., Etti, S., Sewell, H.S., Taragelova, V., Ziak, D., Labuda, M., Kurtenbach, K., 2003. Association of *Borrelia afzelii* with rodents in Europe. Parasitol. 126, 11-20.

Hansen, K., Bangsbo, J.M., Fjordvang, H., Pedersen, N.S., Hindersson, P., 1988. Immunochemical characterization of and isolation of the gene for a *Borrelia burgdorferi* immunodominant 60-kilodalton antigen common to a wide range of bacteria. Infect. Immun. 56 (8), 2047-2053.

Hassler, D., Zöllner, L., Haude, M., 1992. Lyme-Borreliose in einem europäischen Endemiegebiet. Dtsch. Med. Wschr. 117, 767-774.

Hauser, U., Lehnert, G., Lobentanzer, R., Wilske, B., 1997. Interpretation criteria for standardized Western Blots for three European Species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. J. Clin. Microbiol. 35, 1433-1444.

Hauser, U., Lehnert, G., Wilske, B., 1999. Validity of interpretation criteria for standardized Western blots (immunoblots) for serodiagnosis of Lyme borreliosis based on sera collected throughout Europe. J. Clin. Microbiol. 37 (7), 2241-2247.

Hechemy, K.E., Samsonoff, W.A., Harris, H.L., Mc Kee, M., 1992. Adherence and entry of *Borrelia burgdorferi* in Vero cells. J. Med. Microbiol. 36, 4229-4238.

Herxheimer, K., Hartmann, K., 1902. Über Acrodermatitis chronica atrophicans. Arch. Derm. Syph. 61, 57-76.

- Huegli, D., Hu, C.M., Humair, P.F., Wilske, B., Gern, L., 2002. Apodemus Species Mice are Reservoir Hosts of *Borrelia garinii* OspA Serotype 4 in Switzerland. J. Clin. Microbiol. 40 (12), 4735-4737.
- Hunfeld, K.P., Stanek, G., Straube, E., Hagedorn, H.J., Schorner, C., Muhlschlegel, F., Brade, V., 2002. Quality of Lyme disease serology. Lessons from the German Proficiency Testing Program 1999-2001. A preliminary report. Wien. Klin. Wochenschr. 114 (13-14), 591-600.
- Huppertz, H.I., Böhme, M., Standaert, S.M., Karach, H., Plotkin, S.A., 1999. Incidence of Lyme borreliosis in the Würzburg region of Germany. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 18, 697-703.
- Imai, D.M., Barr, B.C., Daft, B., Bertone, J.J., Feng, S., Hodzic, E., Johnston, J.M., Olsen, K.J., Barthold, S.W., 2011. Lyme Neuroborreliosis in 2 Horses. Vet. Pathol. 48 (6), 1151-1157.
- James, F.M., Engiles, J.B., Beech, J., 2010. Meningitis, cranial neuritis, and radiculoneuritis associated with *Borrelia burgdorferi* infection in a horse. J. Am. Vet. Med. Assoc. 237 (10), 1180-1185.
- Jauris-Heipke, S., Liegl, G., Preac-Mursic, V., Rössler, D., Schwab, E., Soutschek, E., Will, G., Wilske, B., 1995. Molecular analysis of the gene encoding the outer surface protein C (OspC) of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: relationship to OspA genotyp and evidence of lateral gene exchange of OspC. J. Clin. Microbiol. 33, 1860-1866.
- Jauris-Heipke, S., Rössle, B., Wanner, G., Habermann, Ch., Rössler, D., Fingerle, V., Lehnert, G., Lobentanzer, R., Pradel, I., Hillenbrand, B., Schulte-Spechtel, U., Wilske, B., 1999. Osp17, a novel immunodominant outer surface protein of *Borrelia afzelii*: recombinant expression in *Escherichia coli* and its use as a diagnostic antigen for serodiagnosis of Lyme borreliosis. Med. Microbiol. Immunol. 187 (4), 213-219.
- Jettmar, H.M., 1957. Über die Rolle der Zecken bei der Verbreitung der zweiwelligen Virus-Meningoencephalitis in Österreich. Anz. Schädlingskd. 30 (9), 129-132.
- Käsbohrer, A., Schönberg, A., 1990. Serologische Untersuchungen zum Vorkommen von *Borrelia burgdorferi* bei Haustieren in Berlin (West). Berl.Münch.Tierärztl. Wschr. 103, 374-378.
- Kahl, O., 1991. Lyme Borreliosis – an ecological perspective of a tick-borne human disease. Anz. Schädlingskd. Pflanzenschutz Umweltschutz 64, 45-55.
- Kahl, O., 1994. Die Zecke als Vektor. In J. Süss (Hrsg.): Durch Zecken übertragbare Erkrankungen: FSME und Lyme-Borreliose. 2. Potsdamer Symposium, 13. März 1993. Schriesheim, 1-19.
- Kawabata, H., Masuzawa, T., Yanagihara, Y., 1993. Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp nov isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. Microbiol. Immunol. 37, 843-848.
- Kraiczy, P., Skerka, Ch., Kirschfink, M., Brade, V., Zipfel, P.F., 2001. Immune evasion of *Borrelia burgdorferi* by acquisition of human complement regulators FHL-1/reconectin and Factor H. Europ. J. Immunol. 31 (6), 1674-1684.
- Klempner, M.S., Noring, R., Rogers, R.A., 1993. Invasion of human skin fibroblasts by the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. J. Infect. Dis. 167 (5), 1074-1081.

- Kramer, M.D., Moter, S., Starke, F., Hofmann, H., Simon, M.M., Wallich, R., 1992. Laboratoriumsdiagnostik bei der B.-burgdorferi-Infektion des Menschen („Lyme-Borreliose“). Aus Lyme-Borreliose Neue Aspekte in Klinik und Diagnostik, II. Erlanger Borreliose-Symposium 27. Juni 1992. S. 67-91
- Krupka, I., Bechtel, M., Loehnert-Thiel, U., Eppendorff, R., Straubinger, R.K., 2012. Borreliose: Möglichkeiten und Perspektiven der Diagnostik. 6. Leipziger Tierärztekongress, AfT-Symposium 21. Januar 2012.
- Le Fleche, A., Postic, D., Girardet, K., Peter, O., Baranton, G., 1997. Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. By 16S ribosomal DNA sequence analysis. Int. Syst. Bacteriol. 47, 921-925.
- Liang, F.T., Alvarez, A.L., Gu, Y., Nowling, J.M., Ramamoorthy, R., Philipp, M.T., 1999. An Immunodominant Conserved Region within the Variable Domain of VlsE, the Variable Surface Antigen of *Borrelia burgdorferi*. J. Immunol. 163, 5566-5573.
- Liang, F.T., Jacobs, M.B., Bowers, L.C., Philipp, M.T., 2002. An immune evasion mechanism for spirochetal persistence in Lyme borreliosis. J. Exp. Med. 195 (4), 415-422.
- Liang, F.T., Brown, E.L., Wang, T., Iozzo, R.V., Fikrig, E., 2004. Protective niche for *Borrelia burgdorferi* to evade humoral immunity. Am. J. Pathol. 165, 977-985.
- Liebesch, G., Assmann, G., Liebesch, A., 1999. Infektion mit *Borrelia burgdorferi* s.l. als Krankheitsursache der Lyme-Borreliose bei Pferden in Deutschland. Prakt. Tierarzt 80 (6), 498-516.
- Liebesch, G., Schlotzhauer, A., Sohns, B., Assmann, G., Liebesch, A., 2002. Isolation of *Borrelia afzelii* from a horse with Lyme Borreliosis. IX Int. Conf. On Lyme Borreliosis and other tick-borne diseases 2002, NY, Poster, P-109.
- Liebesch, A., Liebesch, G., 2003. Biologie und Ökologie der Zecken. In: Horst, H. (Hrsg.), Zeckenborreliose Lyme-Krankheit bei Mensch und Tier, Balingen, Seite 42
- Lindenmayer, J., Weber, M., Onderdonk, A., Plain, J., 1989. *Borrelia burgdorferi* infection in horses. J. Am. Vet. Med. Assoc. 194 (10), 1384.
- Lindenmayer, J., Weber, M., Bryant, J., Marquez, E., Onderdonk, A., 1990. Comparison of indirect immunofluorescent-antibody assay, enzyme-linked immunosorbent assay, and western immunoblot for the diagnosis of Lyme disease in dogs. J. Clin. Microbiol. 28, 92-96.
- Lissmann, B.A., Bosler, E.M., Camay, H., Ormiston, B.G., Benach, J.L., 1984. Spirochaete-associated arthritis (Lyme disease) in a dog. J. Am. Vet. Med. Assoc. 185, 219-220.
- Livesley, M.A., Carey, D., Gern, L., Nuttall, P.A., 1994. Problems of isolating *Borrelia burgdorferi* from ticks collected in United Kingdom foci of Lyme disease. Med. Vet. Entomol. 8, 172-178.
- Luft, B.J., Mudri, S., Jiang, W., Dattwyler, R.J., Gorevic, P.D., Fischer, T., Munoz, P., Dunn, J., Schubach, W.H., 1992. The 93-kilodalton protein of *Borrelia burgdorferi* : an immunodominant protoplasmatic cylinder antigen. Infect. Immun. 60, 4309-4321.
- Ma, Y., Sturrock, A., Weis, J.J., 1991. Intracellular localization of *Borrelia burgdorferi* within human endothelial cells. Infect. Immun. 59 (2), 671-678.

- Ma, B., Christen, B., Leung, D., Vigo-Pelfrey, C., 1992. Serodiagnosis of Lyme borreliosis by western immunoblot: Reactivity of various significant antibodies against *Borrelia burgdorferi*. J. Clin. Microbiol. 30, 370-376.
- Magnarelli, L.A., Anderson, J.F., Johnson, R.C., 1987. Cross-reactivity in serological tests for Lyme disease and other spirochetal infections. J. Infect. Dis. 156 (1), 183-188.
- Magnarelli, L.A., Anderson, J.F., Shaw, E., Post, J.E., Palka, F.C., 1988. Borreliosis in equids in north-eastern United States. Am. J. Vet. Res. 49, (3), 359-362.
- Malloy, D.C., Naumann, R.K., Paxton, H., 1990. Detection of *Borrelia burgdorferi* using the polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 28, 1089-1093.
- Manion, T.B., Khan, M.I., Dinger, J., Bushmich, S.L., 1998. Viable *Borrelia burgdorferi* in the urine of two clinically normal horses. J. Vet. Diag. Invest. 10, 196-199.
- Manion, T.B., Bushmich, S.L., Khan, M.I., Dinger, J., Werner, H., Mittel, L., Laurendeau, M., Reilly, M., 2001. Suspected clinical Lyme disease in horses: Serological and Antigen testing differences between clinically ill and clinically normal horses from an endemic region. J. Equ. Vet. Sci. 21 (5), 231-236.
- Maraspin, V., Ruzic-Sabljic, E., Strle, F., 2006. Lyme borreliosis and *Borrelia spielmanii*. Emerg. Infect. Dis. 12, 1177.
- Marconi, R.T., Liveris, D., Schwartz, I., 1995. Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp nov and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp nov) isolates. J. Clin. Microbiol. 33, 2427-2434.
- Margos, G., Vollmer, S.A., Cornet, M., 2009. A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. Appl. Environ. Microbiol. 75, 5410-5416.
- Margos, G., Hojgaard, A., Lane, R.S., 2010. Multilocus sequence analysis of *Borrelia bissettii* strains from North America reveals a new *Borrelia* species, *Borrelia kurtenbachii*. Ticks Tick Borne Dis. 1, 151-158.
- Markowicz, M., Ladstätter, S., Schötta, A.M., Reiter, M., Pomberger, G., Stanek, G., 2015 . Oligoarthritis caused by *Borrelia bavariensis*, Austria, 2014. Emerg. Infect. Dis. 21 (6)
- Masuzawa, T., Takada, N., Kudeken, M., Fukui, T., Yano, Y., Ishiguro, F., Kawamura, Y., Imai, Y., Ezaki, T., 2001. *Borrelia sinica* sp. nov., a Lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51, 1817-1824.
- Mavin, S., Milner, R.M., Evans, R., Chatterton, J.M.W., Joss, A.W.L., Ho-Yen, D.O., 2007. The use of local isolates in Western blots improves serological diagnosis of Lyme disease in Scotland. J. Med. Microbiol. 56, 47-51.
- Mavin, S., McDonagh, S., Evans, R., Milner, R.M., Chatterton, J.M.W., Ho-Yen, D.O., 2011. Interpretation Criteria in Western Blot Diagnosis of Lyme Borreliosis. Brit. J. Biomed. Sci. 68.1, 5-10.

May, Katharina, 2009. Enzym-Immunoassay und Western Blot zum Nachweis von Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi* sensu lato bei gesunden Pferden. Inaugural-Dissertation der Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich.

Mehlhorn, H., Piekarski, G., 1998. Grundriß der Parasitenkunde. Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm, 5., überarb. und erw. Auflage, 372-392.

Mejlon, H.A., Jaenson, T.G.T., 1993. Seasonal Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* in Different Vegetation Types in Sweden. Infect. Dis. 25 (4), 449-456.

Müller, I., Khanakah, G., Kundi, M., Stanek, G., 2002. Horses and *Borrelia*: Immunoblot patterns with five *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains and sera from horses of various stud farms in Austria and from the Spanish Riding School in Vienna. Int. J. Med. Microbiol. 291 (33), 80-87.

Nefedova, V.V., Korenberg, E.I., Gorelova, N.B., Kovalevskii, Y.V., 2004. Studies on the transovarial transmission of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the taiga tick *Ixodes persulcatus*. Folia Parasitologica 51, 67-71.

Nilsson, A., 1988. Seasonal occurrence of *Ixodes ricinus* (Acari) in vegetation and on small mammals in southern Sweden. Ecography Volume 11, Issue 3, 161-165

Pachner, A.R., Basta, J., Delaney, E., Hulinska, D., 1995. Localization of *Borrelia burgdorferi* in murine Lyme borreliosis by electron microscopy. Am. J. Trop. Med. Hyg. 52 (2), 128-133.

Pal, U., de Silva, A.M., Montgomery, R.R., Fish, D., Anguita, J., Anderson, J.F., Lobet, Y., Fikrig, E., 2000. Attachment of *Borrelia burgdorferi* within *Ixodes scapularis* mediated by outer surface protein. A. J. Clin. Invest. 106, 561-569.

Pal, U., Yang, X., Cheng, M., Bockenstedt, L.K., Anderson, J.F., Flavell, R.A., Norgard, M.V., Fikrig, E., 2004. OspC facilitates *Borrelia burgdorferi* invasion of *Ixodes scapularis* salivary glands. J. Clin. Invest. 113, 220-230.

Pal, U., Wang, P., Bao, F., Yang, X., Samanta, S., Schoen, R., Wormser, G.P., Schwartz, I., Fikrig, E., 2008. *Borrelia burgdorferi* basic membrane proteins A and B participate in the genesis of Lyme arthritis. JEM 205 (1), 133-141.

Panelius, J., Lahdenne, P., Heikkilä, T., Peltomaa, M., Oksi, J., Seppälä, I., 2002. Recombinant OspC from *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii* and *B. garinii* in the serodiagnosis of Lyme borreliosis. J. Med. Microbiol. 51 (9), 731-739.

Philipp, M.T., Bowers, L.C., Fawcett, P.T., Jacobs, M.B., Liang, F.T., Marques, A.R., Mitchell, P.D., Purcell, J.E., Ratterree, Straubinger, R.K., 2001. Antibody Response to IR₆, a Conserved Immunodominant Region of the VlsE Lipoprotein, Wanes Rapidly after Antibiotic Treatment of *Borrelia burgdorferi* Infection in Experimental Animals and in Humans. J. Infect. Dis. 184 (7), 870-878.

Piesman, J., Schneider, B.S., Zeidner, N.S., 2001. Use of Quantitative PCR to Measure Density of *Borrelia burgdorferi* in the Midgut and Salivary Glands of Feeding Tick Vectors. J. Clin. Microbiol. 39 (11), 4145-4148.

Platt, K.B., Novak, M.G., Rowley, W.A., 1992. Studies on the biology of *Ixodes dammini* in the upper midwest of the United States. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1992 Jun 16, 653:78-87

- Postic, D., Ras, N.M., Lane, R.S., Hendson, M., Baranton, G., 1998. Expanded Diversity among California *Borrelia* isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN 127). J. Clin. Microbiol. 36, 3497-3504.
- Postic, D., Garnier, M., Baranton, G., 2007. Multilocus sequence analysis of atypical *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates: description of *Borrelia californiensis* sp. nov., and genomospecies 1 and 2. Int. Med. Microbiol. 297, 263-271.
- Preac-Mursic, V., Wilske, B., Schiertz, G., Pfister, H.W., Einhäupl, K., 1984. Repeated isolation of spirochetes from the cerebrospinal fluid of a patient with meningoradiculitis Bannwarth. Eur. J. Clin. Microbiol. 3, 564-565.
- Preac-Mursic, V., Wilske, B., Schierz, G., 1986. European *Borrelia burgdorferi* isolated from humans and ticks: culture conditions and antibiotic susceptibility. Zbl. Bakt. Hyg. A 263, 112-118.
- Priest, H.L., Irby, N.L., Schlafer, D.H., Divers, T.J., Wagner, B., Glaser, A.L., Chang, Y.F., Smith, M.C., 2012. Diagnosis of *Borrelia*-associated uveitis in two horses. Vet. Ophthalmol. 15 (6), 398-405.
- Ramamoorthi, N., Narasimhan, S., Pal, U., Bao, F., Yang, X.F., Fish, D., Anguita, J., Norgard, M.V., Kantor, F.S., Anderson, J.F., Koski, R.A., Fikrig, E., 2005. The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. Nature 436, 573-577.
- Richter, D., Postic, D., Sertour, N., Livey, I., Matuschka, F.R., Baranton, G., 2006. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56, 873-881.
- Robertson, J., Guy, E., Andrews, N., Wilske, B., Anda, P., Granstrom, M., Hauser, U., Moosmann, Y., Sambri, V., Schellekens, J., Stanek, G., Gray, J., 2000. A European Multicenter Study of Immunoblotting in Serodiagnosis of Lyme Borreliosis. J. Clin. Microbiol. 38 (6), 2097-2102.
- Rössler, D., Eiffert, H., Jauris-Heipke, S., Lehnert, G., Preac-Mursic, V., Teepe, J., Schlott, T., Soutschek, E., Wilske, B., 1995. Molecular and immunological characterization of the p83/100 protein of various *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains. Med. Microbiol. Immunol. 184 (1), 23-32.
- Rössler, D., Hauser, U., Willske B., 1997. Heterogeneity of BmpA (P39) among European Isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and Influence of Interspecies Variability and Serodiagnosis. J. Clin. Microbiol. 35 (11), 2752-2758.
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L., Oliver, J.H. Jr., 2011. Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. Ticks Tick Borne Dis. 2 (3), 123-128.
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Lin, T., Gao, L., Grubhoffer, L., Oliver, J.H. Jr., 2009 a. Delineation of a new species of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, *Borrelia americana* sp. nov. J. Clin. Microbiol. 47, 3875-3880.
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L., Oliver, J.H. Jr., 2009 b. *Borrelia carolinensis* sp. nov., a new (14th) member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex from the southeastern region of the United States. J. Clin. Microbiol. 47, 134-141.
- Rufli, T., Mumcuoglu, Y., 1981. Dermatologische Entomologie: *Ixodidae*, Schildzecken. Schweiz. Rundsch. Med. 70 (9), 362-385.

- Salinas-Meléndez, J.A., Galvan de la Garza, S., Riojas-Valdes, V.M., Wong Gonzalez, A., Avalos-Ramirez, R., 2001. Antibody detection against *Borrelia burgdorferi* in horses located in the suburban areas of Monterrey, Nuevo Leon. *Revista Latinoamericana de Microbiologia* 43 (4), 161-164.
- Salyers, A.A., Witt, D., 2002. Bacterial Pathogenesis, A Molecular Approach. Am. Soc. Microbiol., ed (Washington: ASM Press).
- Schönberg, A., Schmidt, K., Käsbohrer, A., 1989. Eine durch Zecken übertragbare Zoonose: Lyme Borreliose. *Bundesgesundhbl.* 5.
- Schönert, S., Grabner, A., Heidrich, J., Schönberg, A., Nöckler, K., Bahn, P., Luge, E., Brem, S., Müller, W., 2002. Lyme-Borreliose beim Pferd? – Vergleichende Betrachtungen zum direkten und indirekten Erregernachweis. *Prakt. Tierarzt* 83 (12), 1064-1068.
- Schönert, S., 2004. Untersuchungen zum direkten und indirekten Nachweis des Erregers der Lyme-Borreliose beim Pferd unter qualitätssichernden Aspekten. Dissertation, Freie Universität Berlin
- Schwaiger, M., Péter, O., Cassinotti, P., 2001. Routine diagnosis of *Borrelia burgdorferi* (sensu lato) infections using a real-time PCR assay. *Clin. Microbiol. Infect.* 7, 461-469.
- Schwan T. G., Piesman J., Golde W. T., Dolan M. C., Rosa P. A. (1995). Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (7), 2909-2913.
- Scott Hefty, P., Jolliff, S.E., Caimano, M.J., Wikel, S.K., Akins, D.R., 2002. Changes in Temporal and Spatial Patterns of Outer Surface Lipoprotein Expression Generate Population Heterogeneity and Antigenic Diversity in the Lyme Disease Spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 70 (7), 3468-3478.
- Sears, K.P., Divers, T.J., Neff, R.T., Miller, W.H. Jr., McDonough, S.P., 2012. A case of *Borrelia* – associated cutaneous pseudolymphoma in a horse. *Vet. Dermatol.* 23 (2), 153-156.
- Shin, J.J., Bryksin, A.V., Godfrey, H.P., Cabello, F.C., 2004. Localization of BmpA on the Exposed Outer Membrane of *Borrelia burgdorferi* by Monospecific Anti-Recombinant BmpA Rabbit Antibodies. *Infect. Immun.* 72 (4), 2280-2287.
- Simpson, W.J., Schrumpf, M.E., Schwan, T.G., 1990. Reactivity of human Lyme borreliosis sera with a 39-kilodalton antigen specific to *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin. Microbiol.* 28 (6), 1329-1337.
- Simpson, W.J., Schrumpf, M.E., Hayes, S.F., Schwan, T.G., 1991. Molecular and immunological analysis of a polymorphic periplasmic protein of *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin. Microbiol.* 29, 1940-1948.
- Smismans, A., Goossens, V.J., Nulens, E., Bruggeman, C.A., 2006. Comparison of five different immunoassays for the detection of *Borrelia burgdorferi* IgM and IgG antibodies. *Clin. Microbiol. Infect.* 12 (7), 648-655.
- Sonenshine, D.E., 1991. Biology of ticks. Vol. 1. Oxford University Press, New York 1991
- Stanek, G., Hofmann, H., 1994. Krank durch Zecken, FSME und Lyme-Borreliose. V, Wien, 10-90.
- Stanek, G., Reiter, M., 2011. The expanding Lyme *Borrelia* complex – clinical significance of genomic species? *Clin. Microbiol. Infect.* 17 (4), 487-493.

Steere, A.C., Malawista, S.E., Hardin, J.A., Ruddy, S., Askenase, P.W., Andiman, W.A., 1977. Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: The enlarging clinical spectrum. Ann. Intern. Med. 86, 685-698.

Steere, A.C., Malawista, S.E., Newman, J.H., Spieler, P.N., Bartenhagen, N.H., 1980. Antibiotic Therapy in Lyme Disease. Ann. Intern. Med. 93, 1-8.

Steere, A.C., Bartenhagen, N.H., Craft, J.E., Hutchinson, G.J., Newman, J.H., Pachner, A.R., Rahn, D.W., Sigal, L.H., Taylor, E., Malawista, S.E., 1986. Clinical manifestations of Lyme disease. Zbl. Bakt. Hyg. A. 263 (1-2), 201-205.

Steere, A.C., 1989. Lyme disease. N. Engl. J. Med. 321, 586-596.

Stefancikova, A., Adaszek, L., Pet`ko, B., Winiarczyk, S., Dudinak, V., 2008. Serological evidence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in horses and cattle from Poland and diagnostic Problems of Lyme Borreliosis. Ann. Agric. Environ. Med. 15, 37-43.

Szezepanski, A., Furie, M.B., Benach, J.L., Lane, B.P., Fleit, H.B., 1990. Interaction between *Borrelia burgdorferi* and endothelium in vitro. J. Clin. Invest. 85 (5), 1637-1647.

Tälleklint, L., Jaenson, T.G.T., 1996. Seasonal Variations in Density of Questing *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) Nymphs and Prevalence of Infection with *B. Burgdorferi* s.l. in South Central Sweden. J. Med. Entomol. 33 (4), 592-597(6)

Tasai, M., Takashima, I., Kariwa, H., Hashimoto, N., Kondo, T., Sugiura, T., Kamada, M., 1993. Serological Survey of Lyme Borreliosis in Horses in Japan by Immunofluorescent Antibody Test and Fluorescent Enzyme-linked Immunosorbent Assay. Bull. Equine Res. Inst. 30, 37-42.

Van Dam, A.P., Kuiper, H., Vos, K., Widjojokusumo, A., de Jongh, B.M., Spanjaard, L., Ramselaar, A.C., Kramer, M.D., Dankert, J., 1993. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. Clin. Infect. Dis. 17, 708-717.

Venner, M. und Deegen, E., 1996. Interpretation von *Borrelia burgdorferi* Antikörpertitern beim Pferd unter Berücksichtigung der Kenntnisse zur Borreliose beim Menschen – eine Literaturübersicht. Pferdeheilkunde 12, 865-873.

Verma, A., Brissette, C.A., Bowman, A., Stevenson, B., 2009. *Borrelia burgdorferi* BmpA is a laminin-binding protein. Infect. Immun. 77 (11), 4940-4946.

Volkman, D.J., Luft, B.J., Gorevic, P.D., Schultz, J., Padovano, L., 1991. Characterization of an immunoreactive 93-kDa core protein of *Borrelia burgdorferi* with a human IgG monoclonal antibody. J. Immunol. 146, 3177-3182.

Walter, G., Liebisch, A., 1980. Untersuchungen zur Biologie und Verbreitung von Zecken (Ixodoidea, Ixodidae) in Norddeutschland. III. *Ixodes ricinus* (Linnaeus 1758). Z. Angew. Zool. 67 (1980) 449-476

Wang, G., van Dam, A.P., Le Fleche, A., Postic, D., Peter, O., Baranton, G., de Boer, R., Spanjaard, L., Dankert, J., 1997. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). Int. J. Syst. Bacteriol. 47, 926-932.

Weber, K., Burgdorfer, W., 1993. Aspects of Lyme Borreliosis. Berlin Heidelberg

Wilske, B., Preac-Mursic, V., Fuchs, R., Schierz, G., 1990. Diagnostik der Lyme-Borreliose. *Diagnose & Labor* 40, 24-36.

Wilske, B., Bader, L., Pfister, H.W., Preac-Mursic, V., 1991. Diagnostik der Lyme-Neuroborreliose. *Fortschr. Med.* 22, 441-446.

Wilske, B., Barbour, A.G., Bergstrom, S., Burman, N., Restrepo, B.I., Rosa, P.A., Schwan, T., Soutschek, E., Wallich, R., 1992. Antigenic variation and strain heterogeneity in *Borrelia* spp. *Res. Microbiol.* 143, 583-596.

Wilske, B., Preac-Mursic, V., Gobel, U.B., Graf, B., Jauris, S., Soutschek, E., Schwab, E., Zumstein, G., 1993. An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.* 31, 340-350.

Wilske, B., Preac-Mursic, V., 1993. Microbiological Diagnosis of Lyme Borreliosis. Weber, K., Burgdorfer, W. (Hrsgb.): *Aspects of Lyme Borreliosis* 1:267-299, Berlin Heidelberg

Wilske, B., Busch, U., Fingerle, V., Jauris-Heipke, S., Preac Mursic, V., Rossler, D., Will, G., 1996. Immunological and molecular variability of OspA and OspC. Implications for *Borrelia* vaccine development. *Inf.* 24, 208-212.

Wilske, B., Fingerle V., Schulte-Spechtel, U., 2007. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* 49 (1), 13-21.

Wolf, S., 1996. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Ultrastruktur von *Borrelia burgdorferi*. *Vet. med. Diss., FU Berlin.*

Wojciechowska-Koszko, L., Maczynska, L., Szych, Z., Giedrys-Kalemba, S., 2011. Serodiagnosis of borreliosis: indirect immunofluorescence assay, enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 59 (1); 69-77.

Venner, M., Deegen, E., 1996. Interpretation von *Borrelia burgdorferi* Antikörpertitern beim Pferd unter Berücksichtigung der Kenntnisse zur Borreliose beim Menschen – eine Literaturübersicht. *Pferdeheilkunde* 12, 6 (Nov. Dez.) 865-873

Zhioua, E., Aeschlimann, A., Gern, L., 1994. Infection of field-collected *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) larvae with *Borrelia burgdorferi* in Switzerland. *J. Med. Entomol.* 31, 735-766.

Zöller, L., Burkard, S., Schafer, H., 1991. Validity of Western immunoblot band patterns in the serodiagnosis of Lyme borreliosis. *J. Clin. Microbiol.* 29, 174-182.

Zöller, L., Cremer, J., Faulde, M., 1993. Western blot as a tool in the diagnosis of Lyme borreliosis. *Electrophoresis* 14, 937-944.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zellanatomie und Querschnitt von <i>Borrelia burgdorferi</i>	12
Abbildung 2: Entwicklungsstadien von <i>Ixodes ricinus</i>	17
Abbildung 3: Entwicklungszyklus von <i>Ixodes ricinus</i>	18
Abbildung 4: Verbreitung der Lyme-Borreliose in der Welt	21
Abbildung 5: Gegenüberstellung der Testergebnisse der gesamten Pferde im Virotech-Blot und im Mikrogen-Blot	60
Abbildung 6: Gegenüberstellung der Testergebnisse der Fohlen im Virotech-Blot und im Mikrogen-Blot	61
Abbildung 7: Gegenüberstellung der Bandenmuster des Virotech-Blots und des Mikrogen-Blots des Pferdes 23208.....	63
Abbildung 8: Gegenüberstellung der Bandenmuster des Virotech-Blots und des Mikrogen-Blots des Pferdes 25989.....	64
Abbildung 9: Gegenüberstellung der Bandenmuster des Virotech-Blots und des Mikrogen-Blots des Pferdes Shogun.....	65
Abbildung 10: Gegenüberstellung der Bandenmuster des Virotech-Blots und des Mikrogen-Blots des Fohlens aus der Atlanta.....	66
Abbildung 11: Gegenüberstellung der Bandenmuster des Virotech-Blots und des Mikrogen-Blots des Fohlens aus der Givenchy.....	67
Abbildung 12: Gegenüberstellung der Bandenmuster des Virotech-Blots und des Mikrogen-Blots des Fohlens aus der Sunset.....	68
Abbildung 13: Gegenüberstellung der Testergebnisse der gesamten Pferde im Virotech-Blot und im Virotech-ELISA	69
Abbildung 14: Gegenüberstellung der Testergebnisse der Fohlen im Virotech-Blot und im Virotech-ELISA.....	71
Abbildung 15: IFAT – Untersuchungsergebnisse aller untersuchten Pferde zwischen Juli 2005 und Juni 2006	114
Abbildung 16: ELISA M – Untersuchungsergebnisse aller untersuchten Pferde zwischen Juli 2005 und Juni 2006	115
Abbildung 17: ELISA V – Untersuchungsergebnisse aller untersuchten Pferde zwischen Juli 2005 und Juni 2006	116
Abbildung 18: Blot M – Untersuchungsergebnisse aller untersuchten Pferde zwischen Juli 2005 und Juni 2006	117

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Systematische Stellung der Gattung <i>Borrelia</i>	10
Tabelle 2: Genospezies des <i>B. burgdorferi</i> sensu lato-Komplexes.....	11
Tabelle 3: Bezeichnung und Molekulargewicht von Borrelienantigenen	14
Tabelle 4: Taxonomie von <i>Ixodides ricinus</i>	17
Tabelle 5: Stadien des Krankheitsverlaufs beim Menschen.....	23
Tabelle 6: Übersicht über seroepidemiologische Studien.....	34
Tabelle 7: Untersuchungsmaterial für die Diagnostik der Lyme-Borreliose des Menschen	36
Tabelle 8: Untersuchte Pferde nach Rasse, Geschlecht und Geburtsjahr.....	43
Tabelle 9: Zeitpunkte der Blutentnahmen und Anzahl der untersuchten Blutproben	45
Tabelle 10: Punktbewertung der <i>B. burgdorferi</i> -Antigene im IgG-Blot (Blot M)	51
Tabelle 11: Beurteilung der Testergebnisse IgG (Blot M)	51
Tabelle 12: Auswertekriterien (IgG Beurteilung) beim Pferd (Blot V).....	53
Tabelle 13: Reaktionsansatz für die PCR (nach Schwaiger et al., 2001).....	55
Tabelle 14: Reaktionsbedingungen für die PCR(nach Schwaiger et al., 2001).....	55
Tabelle 15: Richtwerte zur Interpretation des Matching-Koeffizienten	56
Tabelle 16: IFAT und ELISA V	57
Tabelle 17: IFAT und Elisa M.....	57
Tabelle 18: IFAT und Blot.....	57
Tabelle 19: ELISA V und ELISA M	58
Tabelle 20: ELISA V und Blot M	58
Tabelle 21: ELISA M und Blot M	58
Tabelle 22: Testsysteme IFAT, ELISA V, ELISA M und Blot M im Vergleich	59
Tabelle 23: Übereinstimmungen der Testergebnisse der gesamten Pferde im Virotech-Blot und im Mikrogen-Blot	60
Tabelle 24: Übereinstimmungen der Testergebnisse der Fohlen im Virotech-Blot und im Mikrogen-Blot	62
Tabelle 25: Testergebnisse aller untersuchten Pferdeseren im Virotech-Blot und im Virotech-ELISA.....	69
Tabelle 26: Übereinstimmungen der Testergebnisse der gesamten Pferde im Virotech-Blot und im Virotech-ELISA.....	70
Tabelle 27: Übereinstimmungen der Testergebnisse der Fohlen im Virotech-Blot und im Virotech-ELISA.....	72
Tabelle 28: Prävalenz von <i>Borrelia burgdorferi</i> in <i>Ixodes ricinus</i>	72
Tabelle 29: Testkits.....	102
Tabelle 30: Chemikalien, Reagenzien und Enzyme	104
Tabelle 31: Geräte	106
Tabelle 32: Laborkleinmaterial und Verbrauchsmaterial.....	107
Tabelle 33: Übersicht über die Blutproben der gesamten untersuchten Pferde der vorausgegangenen Studie aus dem Jahr 2007	108

11 Abkürzungsverzeichnis

AG	Antigen
AK	Antikörper
B.	<i>Borrelia</i>
BKS	Barbour-Stoenner-Kelly-Medium
CA	common-antigen
cm	Zentimeter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EM	<i>Erythema migrans</i>
ERU	Equine rezidivierende Uveitis
Fa.	Firma
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
IFAT/IFT	Indirekter Immunfluoreszenz-Antikörpertest/Immunfluoreszenztest
I.	<i>Ixodes</i>
i.v.	intra venös
Ig	Immunglobulin
kDa	Kilodalton
LCB	Lymphadenosis cutis benigna
LIA	Line Immuno Assay
mg	Milligramm
min.	Minute/Minuten
MKP	Modified-Kelly-Medium nach Preac-Mursic et al.
mM	Millimol
nm	Nanometer
Osp	engl. Outer-surface-protein
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction)
p.i.	post infectionem
s	Sekunden
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
s.l.	sensu lato
SPF	engl. Specific pathogen-free
s.s.	sensu stricto
TMB	Tetramethylbenzidin
U/Min.	Umdrehungen pro Minute
VE	Virotech-Einheiten
VlsE	engl. variable major protein-like sequence, expressed
µl	Mikroliter

12 Anhang

Anhang A:

12.1 Verwendetes Arbeitsmaterial

12.1.1 Testsysteme/Test-Kits

Tabelle 29: Testkits

<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato IFT	
Eindeckmittel	R-biopharm AG, Darmstadt
Objektträger, mit Antigen beschichtet (<i>B.burgdorferi</i> sensu stricto, <i>B. garinii</i> und <i>B. afzelii</i>)	R-biopharm AG, Darmstadt
Nicht im Testkit enthalten:	
anti-horse-IgG FITC-markiert (Fluoreszeinisothiocyanat)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Kontrollseren Pferd (Positiv- und Negativkontrolle)	Serumbank Institut für Bakteriologie und Mykologie, München

<i>Borrelia burgdorferi</i> Veterinär ELISA Spezies <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	
Anti-Pferd-IgG-Konjugat (Kaninchen-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat)	Genzyme Virotech GmbH, Rüsselsheim
Citrat-Stopplösung	Genzyme Virotech GmbH, Rüsselsheim
IgG-cut-off-Kontrolle Pferd	Genzyme Virotech GmbH, Rüsselsheim
IgG-negative-Kontrolle Pferd	Genzyme Virotech GmbH, Rüsselsheim
IgG-positive-Kontrolle Pferd	Genzyme Virotech GmbH, Rüsselsheim
Mikrotiterplatte, mit Antigen beschichtet (<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto)	Genzyme Virotech GmbH, Rüsselsheim
PBS-Verdünnungspuffer (pH 7,2)	Genzyme Virotech GmbH, Rüsselsheim
PBS-Waschpuffer (20x konzentriert, pH 7,2)	Genzyme Virotech GmbH, Rüsselsheim
Tetramethylbenzidin-Substratlösung	Genzyme Virotech GmbH, Rüsselsheim

QIAamp® DNA Mini Kit (51306) Spin-Variante mit Mikrozentrifuge	
AE-Puffer	QIAGEN GmbH, Hilden
AL-Puffer	QIAGEN GmbH, Hilden
ATL-Puffer	QIAGEN GmbH, Hilden
AW1-Puffer	QIAGEN GmbH, Hilden
AW2-Puffer	QIAGEN GmbH, Hilden
Proteinase K-Lösung	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAamp Spin Säulen (mit Silicagel-Membran)	QIAGEN GmbH, Hilden

recomBlot Borrelia horse IgG Spezies <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto, <i>B. garinii</i> und <i>B. afzelii</i>	
anti-Pferd IgG Konjugat (aus Ziege, enthält Thi- merosal)	Fa. Jackson
Chromogenes Substrat Tetramethylbenzidin (TMB)	Mikrogen GmbH, Neuried
Kontrollstreifen (vorentwickelt, kitspezifisch)	Mikrogen GmbH, Neuried
Schwachpositiv Serumkontrolle IgG	Mikrogen GmbH, Neuried
Teststreifen Western-Blot, mit Antigenen be- schichtet (<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto, <i>B. garinii</i> und <i>B. afzelii</i>)	Mikrogen GmbH, Neuried
Waschpuffer (5x konzentriert)	Mikrogen GmbH, Neuried

recomWell Borrelia horse IgG Spezies <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto, <i>B. garinii</i> und <i>B. afzelii</i>	
Anti-Pferd IgG Konjugat	Mikrogen GmbH, Neuried
Chromogenes Substrat Tetramethylbenzidin (TMB)	Mikrogen GmbH, Neuried
Cutoff-Kontrolle	Mikrogen GmbH, Neuried
Mikrotiterplatte, mit Antigen beschichtet (<i>B.</i> <i>burgdorferi</i> sensu stricto, <i>B.garinii</i> , <i>B. afzelii</i>)	Mikrogen GmbH, Neuried
Negative Kontrolle	Mikrogen GmbH, Neuried
Phosphorsäure 25% (Stopplösung)	Mikrogen GmbH, Neuried
Verdünnungspuffer	Mikrogen GmbH, Neuried
Waschpuffer (10x konzentriert)	Mikrogen GmbH, Neuried

<i>Borrelia</i> Veterinär plus OspA Line Spezies <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	
Nitrozellulose Teststreifen mit aufgesprützten Antigenen	Sekisui Virotech GmbH, Rüsselsheim
IgG Cut off Kontrolle, Pferdeserum, vorverdünnt	Sekisui Virotech GmbH, Rüsselsheim
Verdünnungs-/Waschpuffer, pH7,3 (10x konz.), mit Tris und Konservierungsmittel	Sekisui Virotech GmbH, Rüsselsheim
anti-Pferd IgG-Konjugat (100x konz.), Anti Pferd, (Kaninchen)-Alkalische Phosphatase, mit Konser- vierungsmittel	Sekisui Virotech GmbH, Rüsselsheim
Substrat (BCIP/NBT)	Sekisui Virotech GmbH, Rüsselsheim

12.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

Tabelle 30: Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

Aqua dest.	Mikrobiol. Labor LMU
Deionisiertes Wasser	Mikrogen GmbH, Neuried
Ethanol	Roth GmbH, Karlsruhe
Evans-Blue	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Hausinternes Kontrollserum Pferd: 0496	Mikrobiol. Labor LMU
KH_2PO_4	Merck KGaA, Darmstadt
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{ H}_2\text{O}$	Merck KGaA, Darmstadt
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	Merck KGaA, Darmstadt
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt

12.1.3 Rezepte der Puffer und Lösungen

12.1.3.1 Indirekter Immunfluoreszenztest

Wasch- und Verdünnungspuffer (pH 7,4; Rezept des Pettenkofer-Instituts)

Stammlösung:

389,25 g NaCl

171,25 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{ H}_2\text{O}$

19,50 g KH_2PO_4

ad 2500 Aqua dest.

Gebrauchslösung:

Stammlösung wurde 1:20 mit Aqua dest. verdünnt:

100 ml Stammlösung + 1900 ml Aqua dest.

pH wurde gemessen und auf 7,4 eingestellt

0,02% Evans-Blue/PBS

0,02 g Evans-Blue auf 100 ml PBS pH 7,2, um das Auftreten unspezifischer Fluoreszenzen auf den Antigenfeldern zu unterdrücken

12.1.3.2 RecomWell Borrelia (ELISA M)

Waschpuffer

Waschpuffer-Konzentrat wurde mit 1+9 H_2O deionisiert verdünnt

pro Mikrotiterplattenstreifen wurden 5ml Konzentrat mit 45 ml H_2O deion. gemischt

Konjugatlösung

pro Mikrotiterplattenstreifen wurde 1 ml Verdünnungspuffer mit je 10µl anti-Pferd IgG Peroxidase-Konjugat gemischt (Verdünnung 1 + 100)

12.1.3.3 RecomBlot *Borrelia* IgG(Blot M)

Waschpuffer

Ein Teil des Waschpuffer-Konzentrats wurde mit vier Teilen deionisiertem Wasser verdünnt (Verdünnung 1 + 4)

Konjugatlösung

pro Teststreifen wurden 1,5 µl Anti-Pferd IgG Konjugat auf 2 ml gebrauchsfertigen Waschpuffer verwendet (1:1333)

12.1.3.4 *Borrelia* Veterinär plus OspA Line (Blot V)

Verdünnungs-/Waschpuffer

Für 32 Teststreifen (4 Inkubationswannen):

60 ml Konzentrat (10x) + 540 ml Aqua dest. in ein Glasgefäß füllen und auf dem Magnetrührer mischen.

Konjugatverdünnung:

Für 32 Teststreifen + Reserve (4 Inkubationswannen):

600 µl Konjugat + 60 ml Verdünnungs-/Waschpuffer (1:100)

12.1.3.5 DNA-Extraktion

PBS

pH 7,2 (Rezept vom Robert-Koch-Institut)

Lösung a:	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	11,88 g
	Aqua dest. ad	1000 ml
Lösung b:	KH ₂ PO ₄	9,08 g
	Aqua dest. ad	1000 ml
Gebrauchslösung:		
	Lösung a	143 ml
	Lösung b	57 ml
	NaCl	17 g
	Aqua dest.ad	2000 ml

pH messen und einstellen

12.1.4 Geräte

Tabelle 31: Geräte

Absaugsystem mit Desinfektionsfalle	MikrogenGmbH, Neuried
Combitip-Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Feuchte Kammern	Camag
Fluoreszenzmikroskop	LEITZ Orthoplan
iCycler	Qiagen GmbH, Hilden
Inkubationsschrank	MikrogenGmbH, Neuried
Kippschüttler Shaker ST5	Fa. CAT, Itzenbach, Staufen
Magnetrührer	
Mikropipetten	MikrogenGmbH, Neuried
Mikrotiterplatten-Photometer	MikrogenGmbH, Neuried
Multipipette	Eppendorf, Hamburg
Pipetten, Eppendorf Reference	Eppendorf, Hamburg
Pipetten (10, 50, 100, 1000 µl)	Rainin
Schüttler 3016	GFL, Burgwedel
Spektralphotometer für Mikrotiterplatten mit 450/620 nm Filter	Asys Hightech 96
Thermo-Mixer	Eppendorf, Hamburg
Tissue-Lyser	Qiagen GmbH, Hilden
Vortex (Vortex Genie 2)	Scientific Industries
Wärmeschrank	Hereaus

12.1.5 Laborkleinmaterial und Verbrauchsmaterial

Tabelle 32: Laborkleinmaterial und Verbrauchsmaterial

Abdeckfolien	Mikrogen GmbH, Neuried
Abdeckung für ELISA-Platten	
Bechergläser	
Deckgläser (24x60 mm)	
Inkubations-Schalen (mit je 10 Vertiefungen und Kunststoffdeckeln)	Mikrogen GmbH, Neuried
Inkubationswannen	
Messzylinder	Mikrogen GmbH, Neuried
Mikrotiterplatten (U-Form)	
Mikrozentrifuge (Biofuge Pico)	Heraeus
Objektträgerhalter	
Objektträger tableau	
Pipettenspitzen (10, 50, 100, 1000 µl)	
Pipettenspitzen Combitips 10 ml	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen gelb	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen mit Aerosolsperre (10, 50, 100, 1000 µl)	Kisker
Plastikpinzetten	
Reagenzgläser	
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße ohne Deckel 2,0 ml	Eppendorf
Safe-Lock-Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Teströhrchen	Mikrogen GmbH, Neuried
Zellstofftücher	

Anhang B:**12.2 Übersicht Blutproben****Tabelle 33: Übersicht über die Blutproben der gesamten untersuchten Pferde der vorausgegangenen Studie aus dem Jahr 2007**

		Geburtsjahrgang 2005				Geburtsjahrgang 2004				Geburtsjahrgang 2003			
Rasse		Warmblut		Kaltblut		Warmblut		Kaltblut		Warmblut		Kaltblut	
Geschlecht		männlich	weiblich	männlich	weiblich	männlich	weiblich	männlich	weiblich	männlich	weiblich	männlich	weiblich
Blutprobenentnahme Nr. 1: gesamt 124 (IFAT), 142 (ELISA V), 23 (ELISA M), 95 (RecomBlot)													
Gewonnene Blutproben		142											
Untersuchte Blutproben	IFAT	10	19	3	4	8	10	12	5	12	13	6	1
	ELISA V	10	19	3	4	8	10	12	5	12	13	6	1
	ELISA M	2	4	2	2	8	-	-	-	-	13	-	-
	RecomBlot	2	5	2	2	8	10	4	4	12	13	6	1
Blutprobenentnahme Nr. 2: gesamt 123 (IFAT), 143 (ELISA V), 72 (ELISA M), 92 (RecomBlot)													
Gewonnene Blutproben		143											
Untersuchte Blutproben	IFAT	10	18	4	4	11	10	3	8	10	11	5	2
	ELISA V	10	18	4	4	11	10	3	8	10	11	5	2
	ELISA M	2	5	3	2	-	11	7	8	11	11	4	2
	RecomBlot	2	5	3	2	-	11	7	8	11	11	4	2
Blutprobenentnahme Nr. 3: gesamt 122 (IFAT), 139 (ELISA V), 90 (ELISA M), 100 (RecomBlot)													
Gewonnene Blutproben		139											
Untersuchte Blutproben	IFAT	6	13	4	4	11	9	7	8	11	12	6	3
	ELISA V	6	12	4	4	11	9	7	8	11	11	6	3
	ELISA M	2	5	3	2	11	9	7	8	11	3	6	3
	RecomBlot	2	5	3	2	11	9	7	8	11	12	6	3

		Geburtsjahrgang 2002				Deckhengste		Zuchtstuten	
Rasse		Warmblut		Kaltblut		Warmblut	Kaltblut	Warmblut	Kaltblut
Geschlecht			weiblich	männlich	weiblich				
Fortsetzung Blutprobenentnahme Nr. 1: gesamt 125 (IFAT), 142 (ELISA V), 23 (ELISA M), 95 (RecomBlot)									
Gewonnene Blutproben		142							
Untersuchte Blutproben	IFAT	3	4	-	1	1	3	6	5
	ELISA V	3	4	-	-	2	3	14	8
	ELISA M	-	-	-	-	-	-	-	-
	RecomBlot	3	4	-	-	1	3	6	5
Fortsetzung Blutprobenentnahme Nr. 2: gesamt 123 (IFAT), 143 (ELISA V), 72 (ELISA M), 92 (RecomBlot)									
Gewonnene Blutproben		143							
Untersuchte Blutproben	IFAT	3	3	-	-	3	8	6	4
	ELISA V	3	4	-	-	3	8	14	7
	ELISA M	3	3	-	-	-	-	-	-
	RecomBlot	8	3	-	-	1	4	6	4
Fortsetzung Blutprobenentnahme Nr. 3: gesamt 122 (IFAT), 139 (ELISA V), 90 (ELISA M), 100 (RecomBlot)									
Gewonnene Blutproben		139							
Untersuchte Blutproben	IFAT	2	4	-	-	3	9	6	4
	ELISA V	2	4	-	-	3	9	14	6
	ELISA M	2	4	-	-	1	4	5	4
	RecomBlot	2	4	-	-	1	4	6	4

		Geburtsjahrgang 2005				Geburtsjahrgang 2004				Geburtsjahrgang 2003			
Rasse		Warmblut		Kaltblut		Warmblut		Kaltblut		Warmblut		Kaltblut	
Geschlecht		männlich	weiblich	männlich	weiblich	männlich	weiblich	männlich	weiblich	männlich	weiblich	männlich	weiblich
Blutprobenentnahme Nr. 4: gesamt 124 (IFAT), 142 (ELISA V), 94 (ELISA M), 101 (RecomBlot)													
Gewonnene Blutproben		142											
Untersuchte Blutproben	IFAT	8	15	4	4	8	11	7	7	11	11	6	3
	ELISA V	8	15	4	4	8	10	7	6	11	11	6	3
	ELISA M	2	5	3	5	8	9	7	7	11	8	6	3
	RecomBlot	2	5	3	2	8	11	7	6	11	11	6	3
Blutprobenentnahme Nr. 5: gesamt 122 (IFAT), 141 (ELISA V), 97 (ELISA M), 102 (RecomBlot)													
Gewonnene Blutproben		141											
Untersuchte Blutproben	IFAT	6	15	4	4	9	12	7	7	12	11	4	3
	ELISA V	6	15	4	4	9	12	7	7	12	11	4	3
	ELISA M	1	5	3	2	9	12	7	7	12	11	4	3
	RecomBlot	1	5	3	2	9	12	7	7	12	11	4	3
Blutprobenentnahme Nr. 6: gesamt 116 (IFAT), 137 (ELISA V), 96 (ELISA M), 102 (RecomBlot)													
Gewonnene Blutproben		137											
Untersuchte Blutproben	IFAT	7	15	3	4	10	10	6	4	11	11	5	3
	ELISA V	7	15	3	4	10	10	6	4	11	11	5	3
	ELISA M	2	5	3	2	9	10	6	3	12	12	6	3
	RecomBlot	2	5	3	2	10	10	6	3	12	12	6	3

		Geburtsjahrgang 2002				Deckhengste		Zuchtstuten	
Rasse		Warmblut		Kaltblut		Warmblut	Kaltblut	Warmblut	Kaltblut
Geschlecht		männlich	weiblich	männlich	weiblich				
Fortsetzung Blutprobenentnahme Nr. 4: gesamt 124 (IFAT), 142 (ELISA V), 94 (ELISA M), 101 (RecomBlot)									
Gewonnene Blutproben		142							
Untersuchte Blutproben	IFAT	2	3	-	2	2	9	6	5
	ELISA V	2	3	-	-	2	9	6	9
	ELISA M	2	2	-	-	1	4	6	5
	RecomBlot	7	3	-	-	1	4	6	5
Fortsetzung Blutprobenentnahme Nr. 5: gesamt 122 (IFAT), 141 (ELISA V), 97 (ELISA M), 102 (RecomBlot)									
Gewonnene Blutproben		141							
Untersuchte Blutproben	IFAT	3	2	-	-	3	9	6	5
	ELISA V	3	2	-	-	3	9	13	8
	ELISA M	3	2	-	-	1	4	6	5
	RecomBlot	8	2	-	-	1	4	6	5
Fortsetzung Blutprobenentnahme Nr. 6: gesamt 116 (IFAT), 137 (ELISA V), 96 (ELISA M), 102 (RecomBlot)									
Gewonnene Blutproben		137							
Untersuchte Blutproben	IFAT	4	4	-	-	3	6	6	4
	ELISA V	4	4	-	-	3	6	14	7
	ELISA M	4	4	-	-	1	4	6	4
	RecomBlot	9	4	-	-	1	4	6	4

		Geburtsjahrgang 2005				Geburtsjahrgang 2004				Geburtsjahrgang 2003			
Rasse		Warmblut		Kaltblut		Warmblut		Kaltblut		Warmblut		Kaltblut	
Geschlecht		männlich	weiblich	männlich	weiblich	männlich	weiblich	männlich	weiblich	männlich	weiblich	männlich	weiblich
Blutprobenentnahme Nr. 7: gesamt 111 (IFAT), 132 (ELISA V), 97 (ELISA M), 97 (RecomBlot)													
Gewonnene Blutproben		132											
Untersuchte Blutproben	IFAT	8	14	3	2	10	12	6	6	12	12	4	3
	ELISA V	8	14	1	2	10	12	6	6	12	12	4	3
	ELISA M	2	5	1	2	11	12	6	6	12	12	4	3
	RecomBlot	2	5	1	2	11	12	6	6	12	12	4	3
Blutprobenentnahme Nr. 8: gesamt 63 (IFAT), 76 (ELISA V), 46 (ELISA M), 51 (RecomBlot)													
Gewonnene Blutproben		76											
Untersuchte Blutproben	IFAT	7	16	3	3	2	-	-	3	12	5	1	2
	ELISA V	7	16	3	3	2	-	-	3	12	5	1	2
	ELISA M	2	5	3	2	2	-	-	3	12	5	1	2
	RecomBlot	2	5	3	2	2	-	-	3	12	5	1	2
Blutprobenentnahme Nr. 9: 74 (IFAT), 87 (ELISA V), 74 (ELISA M), 76 (RecomBlot)													
Gewonnene Blutproben		87											
Untersuchte Blutproben	IFAT	-	-	-	-	11	11	4	4	8	10	3	1
	ELISA V	-	-	-	-	11	11	6	4	8	10	3	1
	ELISA M	-	-	-	-	11	10	6	4	9	10	3	1
	RecomBlot	-	-	-	-	11	10	6	4	9	10	3	1

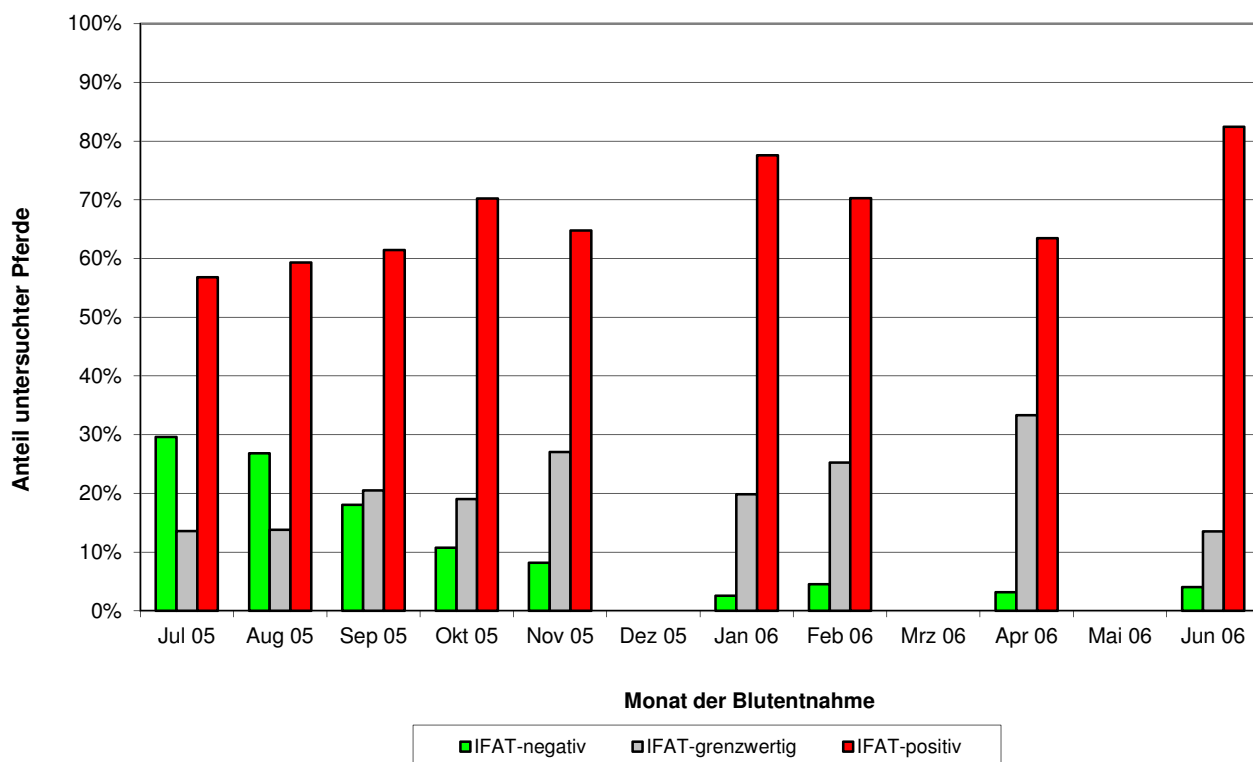
		Geburtsjahrgang 2002				Deckhengste		Zuchtstuten	
Rasse		Warmblut		Kaltblut		Warmblut	Kaltblut	Warmblut	Kaltblut
Geschlecht		männlich	weiblich	männlich	weiblich				
Fortsetzung Blutprobenentnahme Nr. 7: gesamt 111 (IFAT), 132 (ELISA V), 97 (ELISA M), 97 (RecomBlot)									
Gewonnene Blutproben		132							
Untersuchte Blutproben	IFAT	2	3	-	-	1	3	5	5
	ELISA V	3	4	-	-	1	3	13	8
	ELISA M	3	4	-	-	1	3	5	5
	RecomBlot	3	4	-	-	1	3	5	5
Fortsetzung Blutprobenentnahme Nr. 8: gesamt 63 (IFAT), 76 (ELISA V), 46 (ELISA M), 51 (RecomBlot)									
Gewonnene Blutproben		76							
Untersuchte Blutproben	IFAT	2	-	-	-	1	2	4	-
	ELISA V	3	-	-	-	1	2	8	-
	ELISA M	3	-	-	-	1	2	3	-
	RecomBlot	7	-	-	-	1	2	4	-
Fortsetzung Blutprobenentnahme Nr. 9: gesamt 74 (IFAT), 87 (ELISA V), 74 (ELISA M), 76 (RecomBlot)									
Gewonnene Blutproben		87							
Untersuchte Blutproben	IFAT	1	4	-	2	1	4	5	5
	ELISA V	1	4	-	-	1	4	9	8
	ELISA M	2	4	-	-	1	3	5	5
	RecomBlot	4	4	-	-	1	3	5	5

Anhang C:

12.3 Auszüge aus den Ergebnissen der Studie aus dem Jahr 2007

12.3.1 IFAT

**IFAT - Untersuchungsergebnisse aller getesteten Pferde
zwischen Juli 2005 und Juni 2006**



Mo- nat/ Jahr	Jul 0 05	Aug 05	Sep 05	Okt 05	Nov 05	Dez 05	Jan 06	Feb 06	Mrz 06	Apr 06	Mai 06	Jun 06	ge- samt
---------------------	-------------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-------------

IFAT-Untersuchungsergebnisse – absolute Häufigkeit

n	125	123	122	121	122		116	111		63		74	977
positiv	71	73	75	85	79		90	78		40		61	652
nega- tiv	37	33	22	13	10		3	5		2		3	128
grenz- wertig	17	17	25	23	33		23	28		21		10	197

IFAT-Untersuchungsergebnisse – relative Häufigkeit in %

positiv	56,8	59,4	61,5	70,3	64,8		77,6	70,3		63,5		82,4	66,7
nega- tiv	29,6	26,8	18,0	10,7	8,2		2,6	4,5		3,2		4,1	13,1
grenz- wertig	13,6	13,8	20,5	19,0	27,0		19,8	25,2		33,3		13,5	20,2
insg.	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0		100,0	100,0		100,0		100,0	100,0

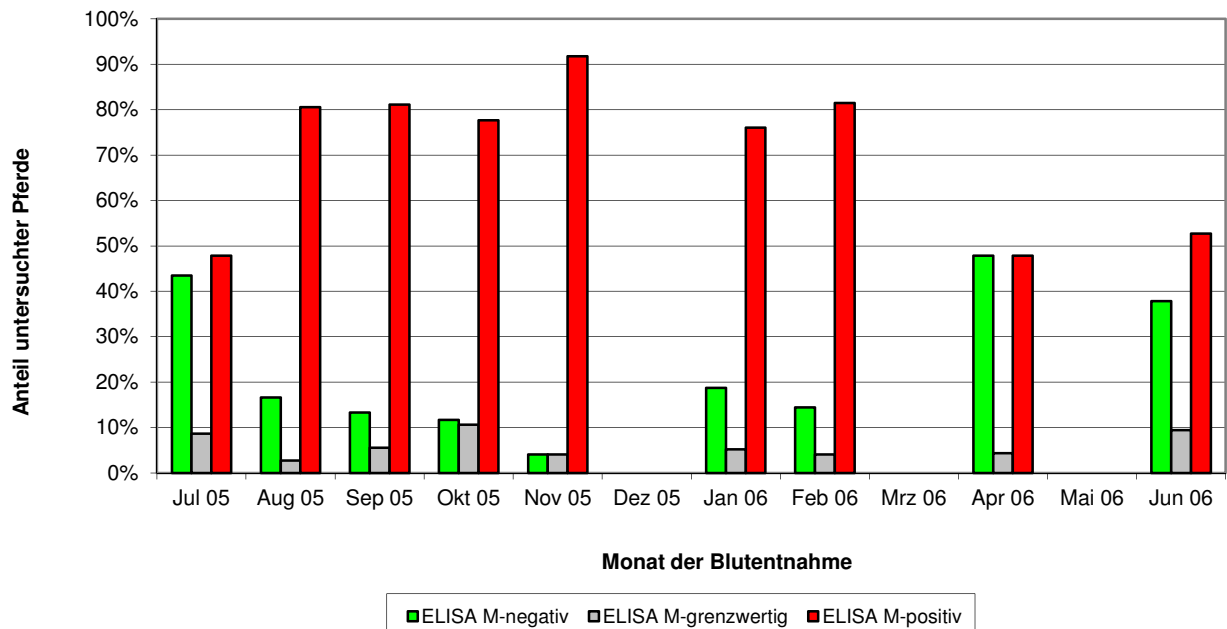
Konfidenzintervalle in %

	47,6- 65,6	50,1- 68,1	52,2- 70,1	61,3- 78,2	55,6- 73,2		68,9- 84,8	60,9- 78,6		50,4- 75,3		71,8- 90,3	63,8- 69,7
--	---------------	---------------	---------------	---------------	---------------	--	---------------	---------------	--	---------------	--	---------------	---------------

Abbildung 15: IFAT – Untersuchungsergebnisse aller untersuchten Pferde zwischen Juli 2005 und Juni 2006

12.3.2 ELISA M

ELISA M - Untersuchungsergebnisse aller getesteten Pferde zwischen Juli 2005 und Juni 2006

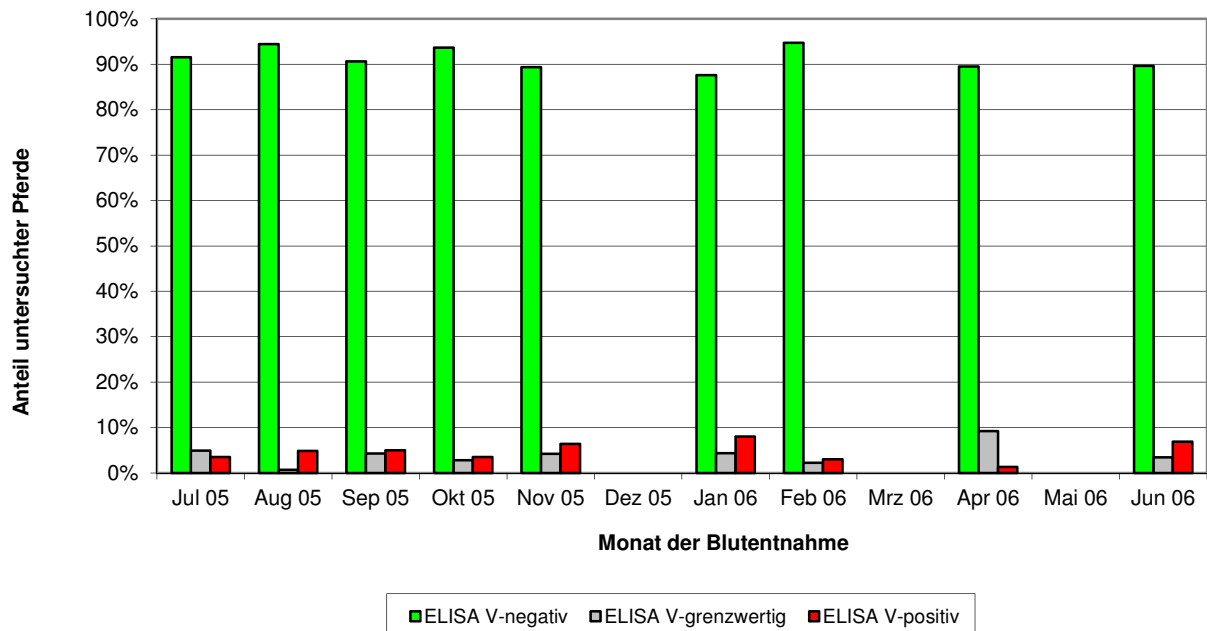


Mo- nat/ Jahr	Jul 05	Aug 05	Sep 05	Okt 05	Nov 05	Dez 05	Jan 06	Feb 06	Mrz 06	Apr 06	Mai 06	Jun 06	ge- samt
ELISA M- Untersuchungsergebnisse - absolute Häufigkeit													
n	23	72	90	94	97		96	97		46		74	689
positiv	11	58	73	73	89		73	79		22		39	517
negativ	10	12	12	11	4		18	14		22		28	131
grenzwertig	2	2	5	10	4		5	4		2		7	41
ELISA M- Untersuchungsergebnisse - relative Häufigkeit in %													
positiv	47,8	80,5	81,1	77,7	91,8		76,0	81,4		47,8		52,7	75,0
negativ	43,5	16,7	13,3	11,7	4,1		18,8	14,5		47,8		37,8	19,0
grenzwertig	8,7	2,8	5,6	10,6	4,1		5,2	4,1		4,4		9,5	6,0
insg.	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0		100,0	100,0		100,0		100,0	100,0
Konfidenzintervalle in %													
	26,8- 69,4	69,5- 88,9	71,5- 88,6	67,9- 85,6	84,4- 96,4		66,3- 84,2	72,3- 88,6		32,9- 63,1		40,8- 64,4	71,8- 78,3

Abbildung 16: ELISA M – Untersuchungsergebnisse aller untersuchten Pferde zwischen Juli 2005 und Juni 2006

12.3.3 ELISA V

ELISA V - Untersuchungsergebnisse aller getesteten Pferde zwischen Juli 2005 und Juni 2006

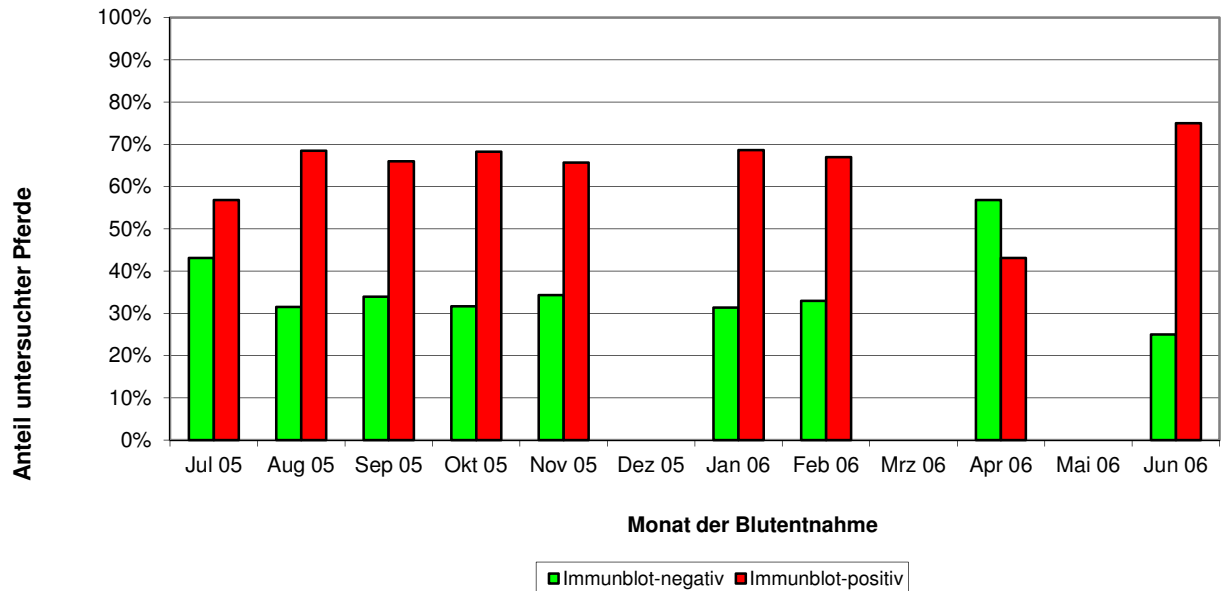


Monat/ Jahr	Jul 05	Aug 05	Sep 05	Okt 05	Nov 05	Dez 05	Jan 06	Feb 06	Mrz 06	Apr 06	Mai 06	Jun 06	ge- samt
ELISA V-Untersuchungsergebnisse – absolute Häufigkeit													
n	142	143	139	142	141		137	132		76		87	1.139
positiv	5	7	7	5	9		11	4		1		6	55
negativ	130	135	126	133	126		120	125		68		78	1.041
grenz- wertig	7	1	6	4	6		6	3		7		3	43
ELISA V-Untersuchungsergebnisse – relative Häufigkeit in %													
positiv	3,5	4,9	5,0	3,5	6,4		8,0	3,0		1,3		6,9	4,8
negativ	91,6	94,4	90,7	93,7	89,4		87,6	94,7		89,5		89,7	91,4
grenz- wertig	4,9	0,7	4,3	2,8	4,2		4,4	2,3		9,2		3,4	3,8
insg.	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0		100,0	100,0		100,0		100,0	100,0
Konfidenzintervalle in %													
	1,2- 8,0	2,0- 9,8	2,1-10,1	1,2- 8,0	3,0- 11,8		4,1- 13,9	0,8- 7,6		0,3- 7,1		2,6- 14,4	3,6- 6,1

Abbildung 17: ELISA V – Untersuchungsergebnisse aller untersuchten Pferde zwischen Juli 2005 und Juni 2006

12.3.4 Blot M

**Blot M - Untersuchungsergebnisse aller getesteten Pferde
zwischen Juli 2005 und Juni 2006**



Monat/ Jahr	Jul 05	Aug 05	Sep 05	Okt 05	Nov 05	Dez 05	Jan 06	Feb 06	Mrz 06	Apr 06	Mai 06	Jun 06	ge- samt
Immunoblot-Untersuchungsergebnisse – absolute Häufigkeit													
n	95	92	100	101	102		102	97		51		76	816
positiv	54	63	66	69	67		70	65		22		57	533
negativ	41	29	34	32	35		32	32		29		19	283
Immunoblot-Untersuchungsergebnisse – relative Häufigkeit in %													
positiv	56,8	68,5	66,0	68,3	65,7		68,6	67,0		43,1		75,0	65,3
negativ	43,2	31,5	34,0	31,7	34,3		31,4	33,0		56,9		25,0	34,7
insg.	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0		100,0	100,0		100,0		100,0	100,0
Konfidenzintervalle in %													
	46,3- 67,0	58,0- 77,8	55,9- 75,2	58,3- 77,2	55,6- 74,8		58,7- 77,5	56,7- 76,2		29,4- 57,8		63,7- 84,2	62,0- 66,4

Abbildung 18: Blot M – Untersuchungsergebnisse aller untersuchten Pferde zwischen Juli 2005 und Juni 2006

Danksagung

„Was lange währt, wird endlich gut!“

An erster Stelle bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn Professor Dr. Reinhard K. Straubinger, der Konzept und Inhalt dieser Arbeit angenommen und begleitet hat. Seine fachlich kompetente und menschlich angenehme Betreuung hatte entscheidenden Einfluss auf das Gelingen dieser Untersuchung.

Ein großes Dankeschön geht an die Mitarbeiterinnen des Labors des Instituts für vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie, Frau Ute Maurer, Frau Andrea Mihalkov und Frau Elena Tzikoula, die mir bei der Durchführung der Tests immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Auch bei den Mitarbeiterinnen des Lyme-Borreliose-Labors des Instituts für Infektionsmedizin und Zoonosen unter der Leitung von Professor Straubinger möchte ich mich bedanken.

Danken möchte ich den Mitarbeitern des Haupt- und Landgestüts Schwaiganger, insbesondere Gestütstierarzt Herrn Dr. Hans-Peter Remler, ohne deren stets freundliche Hilfe die Blutprobenentnahmen bei den Pferden nicht möglich gewesen wären.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. Klaus-Ingmar Pfrepper für die Hilfe bei der Durchführung der Tests im Labor der Firma Mikrogen.

Beim Sammeln der Zecken und deren Bestimmung war mir dankenswerterweise Frau Heidrun Schöl behilflich.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Helfern, die sich für die Blutentnahmen zur Verfügung gestellt haben.

Meiner Freundin Brita Kozian danke ich herzlich für die schnelle und professionelle Hilfe bei der englischen Übersetzung der Zusammenfassung dieser Dissertation.

Ein Dank geht außerdem an das Statistische Beratungslabor der LMU-München.

Unterstützung erhielt diese Arbeit auch von Frau Dr. Yvonne Gall, der ich auf diese Weise danken möchte.

Mein größter Dank geht an meine wundervolle Familie: An meine Eltern, die mich immer und in jedweder Form liebevoll unterstützt haben. Vor allem an meinen Vater, Dr. Andreas Paffhausen, der mir insbesondere bei der formalen Korrektur des Manuskripts sehr behilflich war und mir in früher Kindheit durch seine Dissertation mit dem Zitat „Zur Nachahmung empfohlen“ den ersten Anreiz gab. Papa, ich bin der „Empfehlung“ gefolgt! An meinen Bruder Eric, der mir bei der Formatierung und sogar beim Sammeln der Zecken zur Seite stand, und an meine Schwester Lena, die mir tatkräftig bei einem Blutentnahmetermin behilflich war. Und natürlich an meinen Mann Thomas und meine beiden Söhne Johannes und Benedikt, die viele Stunden ohne mich auskommen mussten. Sie gaben mir Rückhalt und die nötige Aufmunterung.

Ich widme diese Arbeit meiner gesamten Familie und insbesondere meiner Mutter Wiltraud Paffhausen, die den erfolgreichen Abschluss der Promotion leider nicht mehr miterleben konnte.